Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 2.

15. Juli 1917.

Band 34.

Zur Kryoskopie und Refraktometrie der Milch.

Von

Dr. J. Pritzker in Frauenfeld.

[Eingegangen am 14. April 1917.]

Die Verfahren der Milchuntersuchung wurden in den letzten Jahren hinsichtlich Apparatur und Ausführung so ausgebaut und vereinfacht, daß es jetzt möglich ist, auch Laien, wie Käser und Milchhändler, nach kurzer Zeit mit den üblichen Bestimmungen — Spezifisches Gewicht, Gehalt an Fett und Trockensubstanz, Säuregrad — vertraut zu machen, und es gelingt auch solchen Nichtchemikern ganz zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Dies mag zu der selbst in Kreisen der Nahrungsmittelchemiker weit verbreiteten irrigen Ansicht mit beigetragen haben, daß nichts leichter sei, als eine Milch bezüglich etwaiger Verfälschungen zu beurteilen. Man habe ja nur die an der Marktmilch ermittelten Untersuchungsergebnisse mit denjenigen der zugehörigen Stallprobe zu vergleichen, um dann durch ganz einfache Berechnung den Grad der Fälschung zu ermitteln. Für plumpe Verfälschungen, z. B. für starken Wasserzusatz, mag diese Auffassung noch Geltung haben. Anders aber liegen die Verhältnisse, wenn es sich nur um kleinere Wasserzusätze von etwa 5—10 % und darunter handelt. In solchen Fällen wird es der gewissenhafte Begutachter kaum verantworten wollen, nur aus den Differenzen zwischen den nach den Verfahren der gewöhnlichen Milchanalyse ermittelten Gehaltszahlen zwischen Marktmilch und Stallprobe den betreffenden Milchverkäufer zur Verurteilung zu überweisen. Für die Beurteilung der Frage, ob und in welchem Grade eine Verfälschung vorliegt, sind die üblichen Gehaltszahlen unzulänglich, denn eine von kranken Kühen stammende Milch kann unter Umständen Analysenwerte aufweisen, die auf eine Wässerung hindeuten scheinen. In solchen Fällen wird es dem gewissenhaften Analytiker erwünscht sein, noch nach anderen Verfahren seinen Befund nachprüfen und bekräftigen zu können, damit die Schlußfolgerungen als wirklich einwandfrei sich ergeben. Ein derartiges ausführliches Gutachten wird auch dem Richter willkommen sein, denn er wird sich an Hand desselben überzeugen können, daß die abgeleiteten Schlußfolgerungen nicht nur von einzelnen Zahlen, wie z. B. den Differenzen in der fettfreien Trockensubstanz abhängen, sondern daß sie auf verschiedenen Wegen sich ergeben. Aus diesen Gründen ist es für den Analytiker unerlässlich, neben der Ermittlung der üblichen Analysenwerte auch noch anderweitige, insbesondere chemisch-physikalische und biologische Untersuchungsverfahren mit heranzuziehen.

Um eine wirksame Überwachung des Verkehrs mit Milch durchzuführen, ist es einerseits erforderlich, recht oft und recht viele Proben zu untersuchen, andererseits

muß das Hauptgewicht darauf gelegt werden, die Proben einwandfrei und sicher zu beurteilen. Auf Grund der Gehaltszahlen allein ist dies nicht möglich, denn die Milch ist in ihrer Zusammensetzung sehr starken Schwankungen unterworfen und eine „normale“ Milch, die man zu Vergleichszwecken heranziehen könnte, besteht nicht. Wenn eine Milch nur nach dem „Gehalt“ zu beurteilen wäre, so müßte zur sicheren Beantwortung der Frage, ob sie verfälscht ist oder nicht, auch bei noch so hohen Gehaltszahlen immer die zugehörige Stallprobe zum Vergleich herangezogen werden. Welche Unsumme von Mehrarbeit für eine Untersuchungsstelle, die viele Milchproben im Jahre zu beurteilen hat, sich hieraus ergeben würde, liegt auf der Hand.

Nun besitzt aber die Milch trotz der veränderlichen chemischen Zusammensetzung einige physikalische Eigenschaften, die nur innerhalb enger Grenzen schwanken, sodaß gewissermaßen von physikalischen Konstanten der Milch gesprochen werden kann. Die hauptsächlichsten dieser physikalischen Konstanten sind die folgenden:

1. Die Gefrierpunktserniedrigung (Kryoskopischer Befund).
2. Die Lichtbrechung besonders des Chlorcalciumserums nach E. Ackermann (Refraktometrischer Befund).
3. Das elektrische Leitvermögen (Elektrolytischer Befund).

Es sollen in der vorliegenden Abhandlung die bei der Überwachung des Verkehrs mit Milch und bei deren Beurteilung gemachten Erfahrungen und Beobachtungen über die Anwendbarkeit und Eignung der Kryoskopie und Refraktometrie zur Feststellung von Fälschungen besprochen werden. Das elektrische Leitvermögen ist abhängig vom Salzgehalt der Milch. Insbesondere sind größere Schwankungen der Leitfähigkeit bei Milch von kranken Kühen zu erwarten. Die Feststellung des Leitvermögens ist nach verschiedenen Forschern ein wertvolles Hilfsmittel, um Milch von euterkranken Kühen zu erkennen. In dieser Beziehung leistet uns aber die leichter auszuführende Bestimmung der Katalase ebenso gute Dienste. Zum Nachweis eines Wasserzusatzes ist die Bestimmung der Leitfähigkeit weit weniger geeignet als die Kryoskopie und Refraktometrie und sie wird aus diesem Grunde nicht in den Kreis unserer Betrachtungen gezogen.

Über den Wert der Kryoskopie und Refraktometrie für die Milchuntersuchung wird bisher noch verschieden geurteilt. Nachdem E. Ackermann die Refraktometrie des Chlorcalciumserums ausgearbeitet und in die Praxis eingeführt hatte, fand dieses Verfahren eine glänzende Bestätigung bei der Nachprüfung durch Mai und Rothenfusser. Das Verfahren hat in Hunderten und Tausenden von Fällen bei Ermittlung von Fälschungen sehr gute Dienste geleistet. Und dennoch werden vereinzelte Stimmen laut, die die Zuverlässigkeit des Ackermann'schen Verfahrens zum Nachweis von Wasserzusatz bezweifeln. Eine solche absprechende Beurteilung einer von verschiedenen Seiten anerkannten Arbeitsweise läßt sich nur dadurch erklären, daß dem betreffenden Analytiker bei der Nachprüfung des Verfahrens irgend ein Fehler unterlaufen ist, der zu einem irrigen Ergebnis führte. Statt der Fehlerquelle nachzuforschen, wird etwas voreilig das Verfahren als unzuverlässig und unbrauchbar erklärt. Auch bei der Beurteilung der Kryoskopie scheint dies öfters der Fall gewesen zu sein. A. Schmid, der sich eingehend mit der Kryoskopie der Milch beschäftigt hat, spricht sich ebenfalls in diesem Sinne aus. Die Erfahrungen, die er bei der Gefrierpunktsbestimmung gemacht hat, geben ihm eine Erklärung für die verschiedenartige Beurteilung dieser Arbeitsweise. Auch er selbst war anfangs auf dem Punkte,

das Verfahren wieder zu verlassen und es als zur Milchuntersuchung ungeeignet zu betrachten. Erst nachdem seinerseits einige Fehlerquellen aufgedeckt und die Verbesserungsvorschläge von Winter beachtet worden waren, kam er zu der Ansicht, das Verfahren sei nicht nur brauchbar, sondern sogar sehr wertvoll¹⁾.

Über die Kryoskopie der Milch ist bereits eine große Zahl von Arbeiten veröffentlicht worden. Dreser²⁾ hat zuerst die Gefrierpunktsdepression Δ der Milch zu $-0,55$ bis $-0,57^{\circ}$ gefunden. Zwei Jahre später gab Beckmann als Grenzen der Schwankungen $-0,532$ und $-0,58^{\circ}$ für Sammelmilch an. Jordis, ein Schüler Beckmann's, maß Gefrierpunktserniedrigungen bis auf $-0,532$ und $-0,565^{\circ}$. Winter³⁾ fand, daß sich der Gefrierpunkt der Milch nahezu konstant bei $-0,555^{\circ}$ mit sehr geringen Schwankungen hält. Bei Zusatz von Wasser aber nähert sich der Gefrierpunkt mehr und mehr dem Nullpunkt. Jedoch sei zu beachten, daß der Gefrierpunkt auch von dem Säuregrad der Milch beeinflusst wird und in dem Maße herabsinkt, wie der Säuregrad der Milch zunimmt.

Bordas und Genin⁴⁾ fanden Schwankungen in der Gefrierpunktserniedrigung, die sich zwischen $-0,44$ und $-0,56^{\circ}$ bewegten; sie bestritten daher die Zweckmäßigkeit einer Anwendung der Kryoskopie zur Milchprüfung. Einer Entgegnung Winter's zufolge wiederholten Bordas und Genin ihre Versuche, diesmal unter Berücksichtigung aller gegen ihre früheren Arbeiten erhobenen Einwände. Die jetzt erhaltenen Zahlenergebnisse schwanken zwischen $-0,512$ und $-0,529^{\circ}$. Nach Schnorf⁵⁾ schwankt der Gefrierpunkt der Milch immer zwischen $-0,55$ und $-0,57^{\circ}$. A. Schmid⁶⁾ hat bei sorgfältiger Ausführung von Gefrierpunktsbestimmungen an Sammelmilch Schwankungen zwischen $-0,545$ und $-0,56^{\circ}$ beobachtet. Die wertvollsten Aufschlüsse sind nach ihm aus dem Gefrierpunkt der Milch in denjenigen Fällen zu erwarten, wo es sich darum handelt, festzustellen, ob eine Milch gewässert ist oder nicht.

O. Allemann⁷⁾ hat bei 23 Milchproben eine mittlere Gefrierpunktserniedrigung von $-0,571^{\circ}$ gefunden. Zur Bestimmung des Einflusses der Eiweißkörper und des Fettes wurde die Milch durch eine Tonzelle filtriert und das klare, eiweiß- und fettfreie Filtrat zur Untersuchung verwendet. Er konnte feststellen, daß das Fett ebensowenig wie die Eiweißkörper einen Einfluß auf den Gefrierpunkt ausübt.

Stöcklin⁸⁾ gibt in seiner ausführlichen Arbeit über diesen Gegenstand die äußersten Grenzen des Gefrierpunktes zwischen $-0,545$ und $-0,565^{\circ}$, also im Mittel zu $-0,555^{\circ}$ an. In allen Fällen, wo eine Milch einen Gefrierpunkt von unter $-0,53^{\circ}$ aufweist, ist nach seiner Meinung auf Wässerung zu schließen. Dagegen betrachtet er jede Milch, wie die chemische Analyse auch ausfallen mag, wenn sie einen Gefrierpunkt von $-0,55^{\circ}$ aufweist, als ungewässert. Bei Ermittlung des Gefrierpunktes sind natürlich alle vorzunehmenden Korrekturen, die durch den Säuregrad, durch den Zusatz von Konservierungsmitteln usw. bedingt sind, zu berücksichtigen.

¹⁾ Sanitärisch-demographisches Wochenbulletin der Schweiz 1905, 710.

²⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1892, 29, 203; nach Schnorf.

³⁾ Compt. rend. 1895, 120, 1696 und 1896, 121, 123, 1298.

⁴⁾ Compt. rend. 1896, 123, 425; 1897, 124, 568. (Zitiert nach Schnorf.)

⁵⁾ Schnorf, Neue physikalisch-chemische Untersuchungen der Milch. Zürich 1905.

⁶⁾ Sanitärisch-demographisches Wochenbulletin der Schweiz 1905, 710.

⁷⁾ Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 1905, 499.

⁸⁾ Annales des Falsifications 1911, 4, 232.

Er sagt, das Verfahren sei wie kein anderes dazu geeignet, einen Wasserzusatz mit Sicherheit nachzuweisen.

Monnier-Williams¹⁾ gibt den Gefrierpunkt der Milch als Mittel von 141 Proben zu $-0,5345^{\circ}$ an; die äußersten Werte liegen bei $-0,558$ und $-0,514^{\circ}$. Der Gefrierpunkt ist nach ihm die konstanteste Eigenschaft der Milch und er wird durch Wasserzusatz verändert. Das Verfahren kann in allen den Fällen angewendet werden, wo es sich darum handelt, eine stattgefundenen Wässerung zu ermitteln und ihren Umfang annähernd zu berechnen. Die großen experimentellen Schwierigkeiten, die sich der Ermittlung sicherer Werte entgegenstellen, lassen ihn indessen daran zweifeln, ob das Verfahren zur allgemeinen Einführung in die Milchuntersuchung geeignet sei.

Dafür, daß die Gefrierpunktsbestimmung ein sicheres Mittel darstellt, um durch Wässerung verfälschte Milch erkennen zu können, sprechen sich auch noch Hamburger, Carlinfanti, Hotz, Bomstein, Ph. Fischer und Barthel aus. Barthel ist sogar der Meinung, daß bei der Anwendung der kryoskopischen Methode die Erhebung einer Stallprobe überflüssig ist. Mit Recht wird diese Ansicht von Teichert bekämpft, denn es kann mitunter Milch von einer kranken Kuh vorliegen. In solchen Fällen ist der Gefrierpunkt nicht mehr normal. So sind bei Lungentuberkulose und anderen allgemeinen Erkrankungen Gefrierpunkte zwischen $-0,48$ und $-0,55^{\circ}$ beobachtet worden.

Seit einem Jahrzehnt ist von A. Schmid die Kryoskopie am thurgauischen kantonalen Laboratorium eingeführt. Bei jeder verdächtigen Milch, und im Falle einer Beanstandung bei der gefälschten Milch, sowie bei der zugehörigen Stallprobe, wird der Gefrierpunkt ermittelt. Es wurde vom Verfasser in den letzten 6 Jahren im hiesigen Laboratorium an über 1200 verschiedenen unverfälschten Milchproben, wovon etwa 400 amtlich erhobene Stallproben waren, der Gefrierpunkt ermittelt und Werte zwischen $-0,54$ und $-0,56^{\circ}$, im Mittel $-0,55^{\circ}$ gefunden. Selbstverständlich wurden alle diese Proben auch chemisch vollständig untersucht und hierbei als analytisch normal befunden. Die Refraktionszahl des Chlorcalciumserums nach Ackermann bewegte sich bei sämtlichen Proben zwischen 38 und 41, und, worauf hier besonders hingewiesen sei, der Säuregrad dieser Proben schwankte zwischen 6,0 bis 7,5 Graden nach Soxhlet-Henkel.

Allemann hat darauf hingewiesen, daß das Fett auf den Gefrierpunkt keinen Einfluß ausübt. Dieser Befund konnte von mir wiederholt in der Weise bestätigt werden, daß wir die Milch (Vollmilch) aus einer Käserei, wo die Milch zeitweise auf Butter verarbeitet wurde, vor dem Zentrifugieren vollständig untersuchten und den Gefrierpunkt bestimmten. Daraufhin wurde die entsprechende Magermilch mit 0,2 % Fett auf ihren Gefrierpunkt geprüft. Ein nennenswerter Unterschied konnte dabei nicht festgestellt werden. Entsprechende Versuche wurden mit gleichem Ergebnis an einer mittels der Laboratoriumszentrifuge ganz und teilweise entrahmten Milch angestellt.

Die Frage, ob der Gefrierpunkt der Milch durch das Kochen sich ändert, erschien mir nicht klar gelöst, und es wurden eigene Versuche zur sicheren Beantwortung dieser Frage angestellt. Um die Hautbildung und das Schäumen, wie sie beim Kochen in offenen Gefäßen auftreten, möglichst zu verringern, wurde in die von Ackermann zur Gewinnung des Chlorcalciumserums angegebenen Röhren 100 ccm Milch eingefüllt

¹⁾ Annales des Falsifications 1915, 8, 296—321.

und die Kühler auf dieselben aufgesetzt. Die Röhren wurden dann in das kochende Wasserbad eingesetzt. Einige Proben wurden 15 Minuten, die anderen 30 Minuten im lebhaft siedenden Wasser gehalten und nachher mit kaltem Wasser abgekühlt. Durch Umkippen und Drehen der Röhren wurde das Kondenswasser aus den Kühlern herunter gespült und die Milch gut durchgemischt. Die Bestimmung des Gefrierpunktes vor- und nachher ergab, daß keine nennenswerte Änderung desselben eingetreten war.

Nach den bisherigen Forschungen darf es als feststehend betrachtet werden, daß der Gefrierpunkt der Milch weder von Rasse, Alter, Nahrung, noch Jahres- und Melkzeit, d. h. ob Winter- oder Sommermilch, Abend- oder Morgenmilch, beeinflußt wird und daß er im Mittel bei $-0,55^{\circ}$ liegt, sowie nur geringen Schwankungen unterworfen ist. Nur eine Bedingung wird dabei vorausgesetzt, nämlich die, daß die Milch von einem gesunden Tiere stammt, denn durch Krankheit wird das osmotische Gleichgewicht im Organismus gestört und dadurch die Zusammensetzung der Milch und gleichzeitig ihr Gefrierpunkt verändert.

Während die chemische Zusammensetzung der Milch mit zunehmendem Säuregehalt sich im übrigen nur wenig oder gar nicht ändert, wirkt der steigende Säuregrad auf den Gefrierpunkt derart, daß stark saure Milch einen Gefrierpunkt von $-0,70^{\circ}$ und tiefer aufweist. Für den amtlichen Chemiker ist diese Beeinflussung des Gefrierpunktes durch die Säuerung recht unangenehm. Auch durch Zusatz von Konservierungsmitteln wird der Gefrierpunkt herabgesetzt. Diese Umstände gaben verschiedenen Forschern Veranlassung zu einer scharfen Kritik des Verfahrens, und seine Anwendungsfähigkeit zur Beurteilung der Milch wurde in Frage gestellt. Schon Jordis und Winter machten auf den Einfluß der Säure aufmerksam. Es haben dann später Stöcklin und unabhängig von ihm der Verfasser, ohne die Arbeit Stöcklin's gekannt zu haben, versucht, den Einfluß der Säuerung auf rechnerischem und experimentellem Wege zu ermitteln.

Ferner wurde gegen das Verfahren ins Feld geführt, daß seine Ausführung mit großen Schwierigkeiten verbunden und zeitraubend ist, und daß es an die Gewandtheit des Analytikers besondere Anforderungen stellt. So klagt man, daß es nur selten gelingt, untereinander übereinstimmende Ergebnisse zu erhalten. Inwiefern diese Einwände ihre Berechtigung haben, soll auf Grund der gemachten Erfahrungen weiter unten näher dargelegt werden. Es seien indessen zunächst einige Bemerkungen über eine abgekürzte Bezeichnung des Gefrierpunktes vorausgeschickt.

Die Gefrierpunktserniedrigung wird durch das Zeichen Δ dargestellt, welche Ausdrucksweise bereits in früheren Arbeiten über die Kryoskopie gebraucht worden ist. Der Wert Δ ist in bezug auf den Nullpunkt der gewöhnlichen Thermometerskala stets negativ. Wird der Gefrierpunkt normaler Milch $-0,55^{\circ}$ mit demjenigen einer gewässerten Milch von $-0,48^{\circ}$ verglichen, so sollte man dies eigentlich so ausdrücken, daß man sagt, die Gefrierpunktserniedrigung sei durch die Wässerung verkleinert worden. Zuweilen sagt man aber einfach, der Gefrierpunkt sei herabgesetzt worden, welche Ausdrucksweise natürlich unrichtig ist, denn $-0,48^{\circ}$ ist eine höhere Temperatur als $-0,55^{\circ}$. Wird aber die Gefrierpunktserniedrigung in dem Sinne aufgefaßt, daß man darunter versteht, um wieviel Temperaturgrade die echt gelösten Bestandteile einer Milch den Gefrierpunkt des Wassers herabsetzen, so ist dann ein Δ von $0,48^{\circ}$ ein kleinerer Betrag als $0,55^{\circ}$. Auch wird nach dieser Auffassung

das Minuszeichen unnötig. Unbequem ist aber noch immer die Ausdrucksweise in Dezimalen, worunter die Übersichtlichkeit leidet. Man ist in der Praxis aus diesem Grunde bei der Milchanalyse dazu übergegangen, Dezimalen möglichst durch ganze Zahlen zu ersetzen. So wird ja zum Beispiel das spezifische Gewicht einer Milch nicht mit 1,032 bezeichnet, sondern als 32 Grade ausgedrückt, ganz so wie es ja auch mit den Öchsle-Graden beim Süßmost geschieht. Auch bei der Refraktion werden nicht die Brechungsindices in Dezimalen, sondern Skalenteile des Refraktometers angegeben. Es wäre zu begrüßen, wenn sich für die Gefrierpunktserniedrigung bei der Milch die Angabe des Wertes $\Delta \cdot 10^2$ einbürgern würde. Bei normaler Milch wäre $\Delta \cdot 10^2 = 55,0$, nach einer Wässerung um 10% ergäbe sich $\Delta \cdot 10^2 = 49,5$ usw. Auf diese Weise wird die Übersichtlichkeit besonders bei Vergleichen erleichtert. Wo es tunlich erscheint, sollen in der vorliegenden Abhandlung neben Δ im bisherigen Sinne auch die Werte $\Delta \cdot 10^2$ angeführt werden.

Beeinflussung des Gefrierpunktes durch zunehmenden Säuregehalt der Milch.

Die Gefrierpunktserniedrigung ist eine molare Funktion. Werden nämlich in gleichen Mengen eines Lösungsmittels gleiche Gewichtsmengen zweier Stoffe gelöst, so verhalten sich die Gefrierpunkte beider Lösungen wie die Anzahl der Molekeln, die in beiden Flüssigkeiten aufgelöst sind. (Regel von Raoult und Coppet.) Wird eine Milch sich selbst überlassen, so tritt in ihr ein Vorgang auf, der als Milchsäuregärung bezeichnet wird. Die Milchsäurebakterien verwandeln den Milchzucker unter Wasseraufnahme in Milchsäure. Alles in allem wird dieser Vorgang durch folgende Gleichung ausgedrückt:

Jede Molekel Milchzucker wird in vier Molekeln Milchsäure übergeführt. Unter Zugrundelegung der oben angeführten Regel ergibt sich ohne weiteres, daß durch die Verwandlung einer bestimmten Menge Milchzucker in Milchsäure die dieser Menge Milchzucker entsprechende Gefrierpunktserniedrigung um das Vierfache vermehrt wird. Da die Milchsäurezunahme in der Milch in einer Zunahme des Säurewertes ihren Ausdruck findet, so folgt daraus, daß die Beeinflussung von Δ durch den Säuregrad sowohl auf experimentellem als auf rechnerischem Wege sich ermitteln lassen muß.

Nach der grundlegenden Formel von Raoult für die Kryoskopie gilt für das Molekulargewicht folgende Beziehung

$$M = \frac{K \cdot S}{\Delta \cdot L},$$

wo M das Molekulargewicht des gelösten Stoffes, S dessen Gewicht in Grammen, L das Gewicht des Lösungsmittels in Kilogrammen und Δ die beobachtete Temperaturerniedrigung ist. K ist eine Konstante, die von der Natur des Lösungsmittels abhängt. Die Konstante K ist nach van't Hoff $= \frac{2T^2}{W}$, wo T die absolute Schmelztemperatur und W die Schmelzwärme des Lösungsmittels ist. Für Wasser wird diese Konstante von Ostwald-Luther zu 1,86, von van't Hoff zu 1,89 angegeben. Ist M bekannt, so läßt sich daraus Δ berechnen:

$$\Delta = K \frac{S}{M \cdot L}.$$

Wird in dieser Formel $S = M$ gesetzt, und L zu einem Liter, oder bei Wasser zu einem Kilogramm angenommen, so wird

$$\Delta = K,$$

d. h. wenn das Mol einer Verbindung im Liter Wasser gelöst wird, so zeigt diese Lösung eine Gefrierpunktserniedrigung von $1,86$.

Für einsäuerige Basen und für einbasische Säuren bedeutet aber die Lösung eines Mols in einem Liter Wasser nichts anderes als eine Normallösung. Es werden also solche Normallösungen eine Gefrierpunktserniedrigung $\Delta = 1,86^\circ$ aufweisen. Bei zwei- und dreibasischen Säuren bzw. bei zwei- und dreisäurigen Basen wird die Gefrierpunktserniedrigung ihrer Normallösungen $1/2$, $1/3$ usw. des angegebenen Wertes betragen, gemäß folgenden Beispielen:

$$\text{N.-Natronlauge} = 1,86^\circ$$

$$\text{N.-Salzsäure} = 1,86^\circ$$

$$\text{N.-Schwefelsäure} = 0,93^\circ$$

$$\text{N.-Milchsäure} = 1,86^\circ$$

$$\text{N.-Citronensäure} = 0,62^\circ.$$

Für $1/2$, $1/4$, $1/10$ und überhaupt ein $1/x$ N.-Lösung wird sich dieser Wert entsprechend vermindern. Auf Grund obiger Zahlenangaben läßt sich sehr leicht die Gefrierpunktserniedrigung berechnen, die einer Lösung zukommt, welche durch Verdünnung einer bestimmten Anzahl von Kubikzentimetern einer Normallösung zu einem Liter erhalten wurde. Wird z. B. 1 ccm $1/2$ N.-Milchsäurelösung zu einem Liter gelöst, so wird $\Delta = 0,00186^\circ$ betragen. Dabei wird der Einfachheit halber angenommen, daß keine Dissoziation der Lösung stattfindet.

Die Acidität der Milch wird nicht in einem bestimmten Gehalt an Grammten im Liter von einer Säure, sagen wir Milchsäure, ausgedrückt, sondern in Säuregraden. Nach dem in Deutschland und in der Schweiz am meisten angewendeten Verfahren von Soxhlet-Henkel bedeutet ein Säuregrad den Verbrauch von 1 ccm $1/4$ N.-Lauge auf 1 Liter. 10 ccm $1/4$ N.-Milchsäure, die 10 ccm $1/4$ N.-Lauge entsprechen, zu einem Liter gelöst, werden eine Gefrierpunktserniedrigung von $0,00465^\circ$ bewirken. Nun liegen bei der Milch die Verhältnisse so, daß zur Bildung einer bestimmten Menge Milchsäure eine ebenso große Menge Milchzucker verbraucht wird, deren Gefrierpunktserniedrigung abzuziehen ist. Da das Molekulargewicht des Milchzuckers viermal größer ist als dasjenige der Milchsäure, so beträgt die durch Vergären des Milchzuckers bewirkte Verminderung der Gefrierpunktserniedrigung $1/4$ des obigen Wertes von $0,00465^\circ$, also $= 0,00115^\circ$. Die Gefrierpunktserniedrigung, die durch einen Säuregrad hervorgerufen wird, ist somit $0,00465 - 0,00115 = 0,0035^\circ$. Wird z. B. die Gefrierpunktserniedrigung einer Milch von 7 Säuregraden zu $0,55^\circ$ gefunden, so muß nach der Theorie dieselbe Milch bei 9 Säuregraden eine Gefrierpunktserniedrigung von $0,557^\circ$ aufweisen. Nun hat sich aber herausgestellt, daß Theorie und Praxis in diesem Falle nicht miteinander übereinstimmen. Zur experimentellen Ermittlung der Beeinflussung der Gefrierpunktserniedrigung durch die Säuerung der Milch wurden in der Weise Versuche angestellt, daß man bei frischer normaler Milch neben der üblichen analytischen Untersuchung den Gefrierpunkt und den Säuregrad sorgfältig bestimmte. Die Milch wurde dann bei Zimmertemperatur stehen gelassen und darin von Zeit zu Zeit Säuregrad und Gefrierpunktserniedrigung ermittelt. Ähnliche Versuche wurden auch mit von uns selbst gewässerten Milchproben ausgeführt. Es hat keinen Zweck, die vielen in dieser Richtung unternommenen Versuche hier anzuführen. Es seien nur an vier Beispielen die Ergebnisse erläutert:

Nr.	Bezeichnung	Säuregrade nach Soxhlet- Henkel	Gefrier- punkt Δ	Differenz		Beeinflussung des Gefrier- punktes durch 1 Säuregrad
				In Säure- graden	in Δ	
1	Milch am 27. IX. 1912 . . .	7,1	0,55	—	—	—
	„ „ 28. IX. 1912 . . .	13,0	0,59	5,9	0,04	0,007°
	„ „ 29. IX. 1912 . . .	22,5	0,65	9,5	0,06	0,0063°
2	Milch mit 5 %-iger Wässerung am 26. VIII. 1913 . . .	6,0	0,52	—	—	—
	„ 28. VIII. 1913 . . .	12,5	0,57	6,5	0,05	0,008°
	„ 29. VIII. 1913 . . .	23,0	0,645	10,5	0,075	0,007°
3	Milch mit 10 %-iger Wässerung am 26. VIII. 1913 . . .	6,2	0,50	—	—	—
	„ 28. VIII. 1913 . . .	12,0	0,545	5,8	0,045	0,008°
	„ 29. VIII. 1913 . . .	21,5	0,61	9,5	0,065	0,007°
4	Milch mit 15 %-iger Wässerung am 26. VIII. 1913 . . .	5,5	0,46	—	—	—
	„ 28. VIII. 1913 . . .	12,0	0,51	6,5	0,05	0,0077°
	„ 29. VIII. 1913 . . .	20,5	0,57	8,5	0,06	0,007°
	„ 30. VIII. 1913 . . .	27,0	0,62	6,5	0,05	0,008°

Wie schon diese kurze Zusammenstellung zeigt, wird durch je einen Säuregrad die Gefrierpunktserniedrigung um einen Wert von 0,0063—0,008° beeinflusst. In einzelnen Fällen sind auch Werte von 0,009° ermittelt worden, meistens aber fand man 0,008°. Dieser gefundene Wert ist etwas mehr als doppelt so groß, wie der berechnete. Es wurde von verschiedenen Seiten diese Erscheinung dadurch zu erklären versucht, daß die aus dem Milchzucker gebildete Milchsäure mit anderen Verbindungen, die in der Milch vorhanden sind, sich umsetzt. Gewiß spielt dieser Umstand eine gewisse Rolle, doch ist er für die Gefrierpunktserniedrigung fast belanglos und kann unmöglich die große Abweichung der gefundenen Werte von den berechneten erklären.

Zur weiteren Deutung dieser Erscheinung wurden Versuche mit reiner Milchsäure angestellt. Wir bereiteten uns eine genau eingestellte $\frac{1}{4}$ N.-Milchsäurelösung. Von dieser wurden je 1, 2, 3 ccm mit der entsprechenden Menge Wasser auf 100 ccm gebracht. Auf diese Weise erhielten wir, ähnlich wie bei der Milch, Lösungen von 1, 2, 3 . . . Säuregraden. Darin wurde dann die Gefrierpunktserniedrigung ermittelt, und es seien im folgenden die Ergebnisse dieser Versuche angeführt:

Milchsäure im Liter	Säuregrade nach Soxhlet-Henkel	Gefrierpunkt der Lösung (gefunden)	Beeinflussung des Gefrierpunktes durch 1 Säuregrad
0,2250 g	1,0°	0,01°	0,01°
0,4500 „	2,0°	0,02°	0,01°
0,6750 „	3,0°	0,025°	0,0083°
0,9000 „	4,0°	0,030°	0,0075°
1,1250 „	5,0°	0,040°	0,008°
2,2500 „	10,0°	0,070°	0,007°
3,3750 „	15,0°	0,100°	0,007°

Aus diesen Bestimmungen ergibt sich, daß je 1 Säuregrad die Gefrierpunkts-erniedrigung um einen Betrag von $0,007-0,01^{\circ}$ beeinflußt. Auch hier ist also der gefundene Wert mehr als doppelt so hoch, wie der berechnete. Die Erklärung dieser Erscheinung liegt in der Dissoziation der Milchsäure in wässriger Lösung.

Um noch den Einwand zu entkräften, daß bei der Bestimmung des Säuregrades der Milch der Endpunkt der Titration schwer festzustellen sei, und daß der Einfluß der Säure auf den Gefrierpunkt daher nicht genau bewertet werden könne, wurde noch auf einem dritten Wege versucht, die Richtigkeit der obigen Korrektur für jeden Säuregrad nachzuprüfen. Zu diesem Zwecke zogen wir das Chlorcalciumserum nach E. Ackermann zu den Gefrierpunktsbestimmungen heran. Es geschah dies folgendermassen:

Aus einer Milch von normaler Beschaffenheit mit der Refraktionszahl 39,1 und dem Gefrierpunkt $-0,55^{\circ}$ wurde das Chlorcalciumserum hergestellt und in diesem aus der Röhre abgegossenen Serum der Gefrierpunkt zu $-0,595^{\circ}$ ermittelt; der Säuregrad des Serums betrug $5,4^{\circ}$ nach Soxhlet-Henkel. Die gleichen Zahlen ergab ein zweiter Versuch mit filtriertem Serum. Die Milch wurde einen Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen und darauf wiederum das Chlorcalciumserum hergestellt. Das Serum zeigte jetzt einen Gefrierpunkt von $-0,655^{\circ}$; der Säuregrad des Serums betrug $12,8^{\circ}$. Die Zunahme des Säuregrades um $12,8-5,4=7,4^{\circ}$ bewirkte eine Gefrierpunktsverschiebung von $-0,060^{\circ}$ und somit jeder Säuregrad eine solche von $0,008^{\circ}$.

Die Versuche mit der Säuerung von sich selbst überlassener Milch, diejenigen mit wässrigen Milchsäurelösungen von verschiedenen Säuregraden und mit dem Chlorcalciumserum nach Ackermann ergaben also übereinstimmend, daß jeder Säuregrad den Gefrierpunkt der Milch um $0,008^{\circ}$ beeinflußt. Stöcklin gibt die Erhöhung des Gefrierpunktes bei der Bildung von 1 g Milchsäure im Liter, was rund $5,0$ Säuregraden nach Soxhlet-Henkel entspricht, zu $0,05^{\circ}$ an; jeder Säuregrad würde somit den Gefrierpunkt um $0,01^{\circ}$ beeinflussen. Dieser Wert scheint mir entschieden zu hoch gegriffen zu sein. Die Abweichung mag vielleicht dadurch bedingt sein, daß Stöcklin und ich diese Werte verschieden berechnen. Stöcklin bezieht alle Werte auf den ursprünglichen Gefrierpunkt einer Milch. Dies geschieht in der Weise, daß er den durch die Bestimmung des Säuregehaltes ermittelten Wert in Gramme Milchsäure für ein Liter umrechnet, von diesem Wert einen bestimmten Betrag, der den sauren Salzen entsprechen soll, abzieht, den Rest mit $0,5$ multipliziert und das Ergebnis vom ermittelten Gefrierpunkt abzieht. Nun ist aber der Gehalt an sauren Salzen nicht immer gleich und der Säuregrad von frischer Milch kann, noch bevor die Milchsäuregärung begonnen hat, verschieden sein. Um diesen Fehler zu vermeiden, erscheint es mir richtiger, den Gefrierpunkt nicht auf milchsäurefreie Milch, sondern auf einen bestimmten Säuregrad der Milch zu berechnen. Rund 7 Säuregrade sind für frische Milch normal.

Hat man z. B. eine Milch von 18 Säuregraden nach Soxhlet-Henkel, die einen Gefrierpunkt von $0,61^{\circ}$ aufweist, so beträgt der Gefrierpunkt derselben Milch bei 7 Säuregraden $-0,61-(11 \cdot 0,008)=-0,522^{\circ}$. Weist die entsprechende Stallprobe bei 7 Säuregraden einen Wert von $-0,55^{\circ}$ auf, so ergibt sich ohne weiteres ein Wasserzusatz von 5% .

Die Beeinflussung des Gefrierpunktes und der Refraktion durch Konservierungsmittel.

Zur Haltbarmachung von Milchproben im Laboratorium zwecks später auszuführender Untersuchungen oder Nachprüfungen sind eine ganze Reihe von Konservierungsmitteln empfohlen worden.

Am häufigsten verwendet man Formaldehyd, indem man 1 ccm einer 40⁰/₁₀₀-igen Formaldehydlösung auf 1 l Milch zusetzt, oder dann Kaliumbichromat, von dem 1 g zum Liter Milch zugegeben wird. In unserem Laboratorium werden die aufzubewahrenden Proben ausschließlich mit Formaldehyd haltbar gemacht und zwar im oben angegebenen Mengenverhältnis. Durch diesen Zusatz von 1⁰/₁₀₀ Formaldehyd wird die Refraktion fast gar nicht beeinflußt, dagegen wird der Gefrierpunkt merklich erniedrigt. So haben Versuche mit wässerigen Lösungen von Formaldehyd sowie mit Milch, der verschiedene Mengen des Aldehyds zugesetzt worden waren, folgendes ergeben:

Formaldehydzusatz	Gefrierpunktserniedrigung
1,0 ⁰ / ₁₀₀	0,03 ⁰
2,0 ⁰ / ₁₀₀	0,055—0,060 ⁰

Bei einer Milch, die eine Gefrierpunktserniedrigung von —0,55⁰ aufweist, wird dieser nach Zusatz von 1⁰/₁₀₀ Formaldehyd —0,58⁰ betragen; bei größeren Zusätzen entsprechend mehr. Da der Gefrierpunkt durch Formaldehydzusatz verhältnismäßig stark beeinflußt wird, so empfiehlt es sich, diese Zusätze nie von fremder Hand besorgen zu lassen.

Durch Zusatz von Kaliumbichromat werden sowohl Refraktion wie Gefrierpunkt beeinflußt und zwar erhöht. Durch Versuche wurde folgendes ermittelt:

Kaliumbichromat- Zusatz	Erhöhung	
	der Refraktionszahl (Skalenteile des Refraktometers)	der Gefrierpunkts- erniedrigung
1 ⁰ / ₁₀₀	0,45	0,02 ⁰
2 ⁰ / ₁₀₀	0,90	0,04 ⁰
4 ⁰ / ₁₀₀	1,80	0,075 ⁰
10 ⁰ / ₁₀₀	4,50	0,185 ⁰ .

Wie sich aus der Zusammenstellung ergibt, erhöht ein Zusatz von 1⁰/₁₀₀ Kaliumbichromat die Refraktionszahl um 0,5 Skalenteile des Zeiß'schen Refraktometers, die von der Refraktionszahl des Chlorcalciumserums einer haltbargemachten Milch abziehen sind. Ebenso hat man für jedes Gramm Kaliumbichromat auf 1 l Milch 0,02⁰ abziehen.

Das Kaliumbichromat hat als Konservierungsmittel vor dem Formaldehyd entschieden manche Vorteile. So wird durch Zusatz von Bichromat die Milch schon in der Farbe gekennzeichnet. Ferner kann die zugegebene Menge Kaliumbichromat mit Leichtigkeit in der Weise ermittelt werden, daß man sich Typen von Milch, die 1,0, 1,5, 2,0 usw. pro Mille Kaliumbichromat enthalten, herstellt, und mit diesen Typen die zu untersuchende Probe der Farbe nach vergleicht. Als ein Nachteil des Kaliumbichromats muß der Umstand betrachtet werden, daß dieser Zusatz den Säuregrad der Milch stark beeinflußt. So konnte von mir beobachtet werden, daß eine Milch, die 7,0 Säuregrade aufwies, nach Zusatz von 1,0⁰/₁₀₀ Kaliumbichromat einen Säuregrad von 10,5 zeigte. Da bei der Kryoskopie der Säuregrad der Milch unbedingt berück-

sichtigt werden muß, ist diese Eigenschaft des Kaliumbichromats nicht außer acht zu lassen. Zugunsten des Formaldehyds muß anderseits erwähnt werden, daß er weder die Refraktion noch den Säuregrad merklich beeinflusst.

Technik der Gefrierpunktsbestimmung.

Nachdem im Vorangegangenen der Einfluß der Säuerung der Milch und der verschiedenen Konservierungsmittel auf ihren Gefrierpunkt besprochen worden ist, sollen hier die Einzelheiten des Arbeitsverfahrens eingehend erörtert werden, denn es steht außer Zweifel, daß gerade bei der praktischen Ausführung der Bestimmung die meisten Fehler begangen werden, besonders wenn der Analytiker das Verfahren nur ab und zu anwendet. Es ist doch sehr auffallend, daß eben diejenigen, die regelmäßig nach diesem Verfahren arbeiten, seinen großen Wert einstimmig anerkennen, und daß andererseits gerade vonseiten derjenigen, die diese Bestimmung selten ausführen, über ihren Wert für die Praxis der Milchkontrolle weniger günstig geurteilt wird. Van der Laan¹⁾ ist mit Recht davon überzeugt, daß die Ursache dieser Meinungsverschiedenheiten in der großen Zahl von Fehlerquellen gesucht werden muß, die ihren Einfluß bei dieser Bestimmung geltend machen können. Diesem Umstande ist es auch zuzuschreiben, daß in der physiologischen Literatur viele Reihen von Gefrierpunkten von verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Galle und Milch, ermittelt wurden, die wesentlich größere Abweichungen aufweisen, als sie in Wirklichkeit vorkommen. Es gibt mir dies Veranlassung, die praktische Seite der Gefrierpunktsbestimmung in allen Einzelheiten ausführlich zu behandeln.

Sozusagen die Seele des ganzen Verfahrens ist das Thermometer, von dessen Eigenschaften sehr vieles abhängt. Es bestehen zwei Arten von Thermometern für kryoskopische Zwecke:

1. Solche mit festem Nullpunkt und mit einer Teilung in wirkliche Grade.
2. Solche nach Beckmann mit veränderlichem Nullpunkt und willkürlicher Skala.

Von verschiedenen Forschern werden in der letzten Zeit für Gefrierpunktsbestimmungen in der Milch die Thermometer mit festem Nullpunkt als besonders geeignet empfohlen. In unserer Praxis bedienen wir uns seit Jahren eines Beckmann'schen Thermometers mit veränderlicher Skala, das sehr gute Dienste leistet. Diese Thermometer haben noch den Vorteil, daß sie nicht nur für Milch, sondern auch für andere Stoffe, deren Gefrierpunkt zwischen 0 und 100° und darüber liegt, angewendet werden können. Um ein und dasselbe Thermometer bei ganz verschiedenen Temperaturen benutzen zu können, hat bekanntlich Beckmann das obere Ende der Kapillare umgebogen und mit einer Erweiterung versehen, die dazu dient, beliebige Mengen Quecksilber dem Behälter zu entnehmen. Die Einstellung auf den gewünschten Temperaturbereich ist keine leichte Sache und verlangt manchmal sehr viel Geduld. Bei einem Thermometer mit festem Nullpunkt fällt natürlich diese Arbeit fort.

Die Einstellung für Zwecke der Milchkryoskopie geschieht am besten folgendermaßen: In einem Wasserbade wird das Wasser durch Einwerfen von Eisstücken auf rund 3° abgekühlt. Die Badtemperatur wird mittels eines gewöhnlichen, am besten in 1/10° geteilten Thermometers bestimmt. Nun wird das Beckmann-

¹⁾ Biochemische Zeitschrift 1915, 71, 289.

sche Thermometer in das Wasserbad eingetaucht. Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, trennt man das überschüssige Quecksilber vom Quecksilberfaden, indem man das Thermometer mit einer Hand faßt und auf deren Gelenk mit der anderen Hand einen kurzen Schlag gibt, um eine plötzliche Erschütterung zu bewirken. Ist die Entfernung des überschüssigen Quecksilbers gut gelungen, so kommt der Nullpunkt etwa in die Mitte der willkürlichen Skala zu stehen.

Bei einzelnen Thermometern reißt beim Abkühlen der Faden stets ab, oder es bleibt das letzte Stück des Fadens in der Biegung der Kapillare hängen. Solche Thermometer werden am besten dem Hersteller als unbrauchbar zurückgeschickt. Gleich unbrauchbar sind Thermometer, bei denen der Übergang von der Kapillare zur Erweiterung kein allmählicher, sondern ein plötzlicher ist. Nun dürften aber solche Fälle sehr selten sein, denn die in Deutschland verfertigten und in den Handel gebrachten Beckmann'schen Thermometer zeichnen sich durch gute Ausführung aus. Da bei dem vorliegenden Verfahren nur kleine Temperaturunterschiede gemessen werden, so genügt ein Skalenbereich von etwa 5° . Das von uns verwendete Beckmann'sche Thermometer stammt von der Firma Franz Huguershoff in Leipzig. Es ist ein Thermometer mit feiner Kapillare, die so eng ist, daß 5° Celsiusgrade auf 300 mm Skalenlänge sich erstrecken, sodaß eine Teilung in Zehntel- und Hundertstel Grade möglich ist, die dem bewaffneten Auge selbst die Schätzung von Tausendstel Graden erlaubt. Die Temperatur muß bei kryoskopischen Messungen mit der allergrößten Genauigkeit bestimmt werden, was selbstverständlich nur mit Hilfe eines gewöhnlichen Laboratoriumsthermometers auch dann nicht geschehen kann, wenn dasselbe etwa mit einem Normal-Thermometer verglichen ist und die wichtigsten Fehlerquellen berücksichtigt wurden, denn auch in solchen Fällen beträgt die Genauigkeit $\pm 0.05^{\circ}$.

Bei der großen Bedeutung, welche die Temperaturmessung für die Kryoskopie hat, erscheint eine etwas ausführlichere Besprechung der bezüglichen Technik und der Fehlerquellen als gerechtfertigt. Es muß ausdrücklich betont werden, daß solche Bestimmungen nicht sorglos ausgeführt werden können. Die wichtigsten Fehlerquellen sind die folgenden:

1. Die Nachwirkungserscheinungen des Glases.
2. Der herausragende Faden.
3. Der tote Gang.
4. Die Ungenauigkeit der Skala.

Die Nachwirkungserscheinungen des Glases sind durch Zustandsänderungen bedingt und haben zur Folge, daß das Volumen des Thermometergefäßes nicht bloß von der jeweiligen Temperatur, sondern auch von der Vorgeschichte des jeweiligen Zustandes abhängt. Wird z. B. ein Thermometer auf 100° erhitzt und bald darauf auf 0° abgekühlt und dieser Punkt vermerkt, dann nach einiger Zeit wiederum erwärmt und von neuem auf 0° abgekühlt, so wird man beobachten, daß der neue Eispunkt mit dem ersten nicht zusammenfällt, sondern er liegt bald höher, bald tiefer als der zuerst beobachtete. Offenbar hält die beim Erhitzen stattfindende Ausdehnung des Glases mit der beim Abkühlen erfolgenden Zusammenziehung nicht gleichen Schritt; die Ausgleichung erfolgt wesentlich langsamer als die Temperatureinstellung. Infolge dieser Vorgänge zeigt ein Thermometer ein allmähliches Ansteigen oder Sinken des Eispunktes gegenüber der festgedachten Skala. Es gibt also keinen festen Eispunkt; dieser ist, wie der Fachausdruck lautet, „deprimiert“

und diese „Depression“ verschwindet nur langsam im Laufe der Zeit. Die aus der Volumenänderung des Glases sich ergebende Unsicherheit in der Temperaturmessung wird in der Weise ausgeschaltet, daß man unmittelbar nach der Gefrierpunktsbestimmung der Milch eine Eispunktsbestimmung im destillierten Wasser folgen läßt. Dieses Verfahren ist das sicherste. Bei einer größeren Versuchsreihe, z. B. von 12 Gefrierpunktsbestimmungen in der Milch, verfuhr ich in der Weise, daß ich zu Anfang, in der Mitte und am Ende der Versuchsreihe den Eispunkt unter gleichen Bedingungen bestimmte. Selten waren irgendwelche nennenswerte Abweichungen festzustellen. Bei einer Versuchsdauer von einer Stunde schwankte der Eispunkt nur um etwa 0,001 bis 0,002°. Wurde das Thermometer am Morgen gebraucht und dann etwa am Nachmittage wieder, so betrug die Unterschiede im Eispunkt zuweilen 0,001 bis 0,002°. An einem und demselben Tage traten selten größere Abweichungen auf. Im allgemeinen wurden bei kurz aufeinanderfolgenden Bestimmungen nie irgendwelche Unstimmigkeiten in der Lage des Eispunktes beobachtet.

Über die Größenordnung der in Betracht kommenden Änderungen und Änderungsgeschwindigkeiten kann man sich aus folgenden Angaben eine Vorstellung machen: So z. B. war der Stand des Eispunktes am 2. Februar 1916 bei 1,75° der willkürlichen Thermometer-Skala. Am 8. Juni 1916 war der Stand des Eispunktes bei 2,61° derselben Skala. Für diese verhältnismäßig kurze Zeit eine immerhin beträchtliche Verschiebung des Eispunktes.

Der herausragende Faden: Der aus der Kältemischung herausragende Quecksilberfaden hat selbstverständlich nicht die Temperatur der Quecksilberkugel, sondern die höhere Temperatur der umgebenden Luft. Es bedingt dies eine Verlängerung des Fadens, welcher Umstand berücksichtigt werden sollte, indem dafür eigentlich eine entsprechende Korrektur anzubringen wäre. Da es aber bei der Milchkryoskopie nur um kleine Temperaturdifferenzen sich handelt und da nach der Gefrierpunktsbestimmung der Milch der Nullpunkt unter gleichen Bedingungen bestimmt wird, kann von einer Korrektur Umgang genommen werden. Es ist aber genau darauf zu achten, daß unter den gleichen Bedingungen gearbeitet wird; es darf also nicht zuerst der Gefrierpunkt der Milch etwa in einem kalten Raume, der Nullpunkt bald darauf in einem warmen Zimmer bestimmt werden. Auch ist zu vermeiden, daß während der Versuchsdauer sich etwa starke Gasflammen in der Nähe befinden, welche die umgebende Luft erwärmen und so die Bedingungen, unter denen gearbeitet wird, verändern.

Der tote Gang: Thermometer, wie sie für kryoskopische Zwecke gebraucht werden, also mit besonders feiner Kapillare, weisen eine Eigentümlichkeit auf, die Ostwald-Luther¹⁾ als toten Gang bezeichnen; d. h., das Thermometer zeigt bei ein und derselben Temperatur einen niedrigeren Stand, wenn es ihn aufsteigend, und einen höheren Stand, wenn es ihn absteigend erreicht. Diese Erscheinung rührt von Widerständen zufolge Kapillaritätserscheinungen her. Es handelt sich um Widerstände, welche die Wandungen der engen Röhre ihrer ganzen Länge nach dem sich bewegendem feinen Quecksilberfaden entgegensetzen. Der Übelstand tritt aber nur ein, wenn das Thermometer sich im Ruhezustande befindet; er verschwindet indessen zum größten Teil, wenn man das Thermometer durch Erschütterungen oder durch Anklopfen in senkrechter Richtung zur Thermometerachse oder in ähnlicher Weise

¹⁾ Ostwald-Luther, Physikochemische Messungen. 3. Aufl., S. 92.

aus dem Ruhestande herausbringt. Von verschiedenen Forschern sind zu diesem Zwecke elektrisch betriebene Erschütterungsvorrichtungen empfohlen worden, die dem Thermometer 1000 bis 3000 Erschütterungen in der Minute erteilen. Eine solche Vorrichtung wurde von mir nicht benutzt, denn dasselbe Ziel wird erreicht, wenn man das Thermometer bei Beginn der Temperatursteigerung mit dem Finger senkrecht zur Achse öfters anklopft und den höchsten erreichten Stand der Quecksilbersäule als richtigen Punkt abliest.

Dies sind die hauptsächlichsten Fehlerquellen, die bei der Handhabung des Beckmann'schen Thermometers unbedingt zu berücksichtigen sind, und zweifellos hat die Nichtbeobachtung derselben manchen Analytiker zu einer unrichtigen Beurteilung des Wertes kryoskopischer Messungen verleitet. Es ist beispielsweise ganz unzulässig, wenn von verschiedenen Seiten, so von Stöcklin, vorgeschlagen wird, den Eispunkt nur von Zeit zu Zeit, etwa alle 14 Tage oder jeden Monat, zu bestimmen.

Von den weiteren Fehlerquellen, die aber nicht durch das Thermometer bedingt werden, sind noch folgende zu erwähnen:

1. Zu tiefe Temperatur des Kühlbades: Dabei wird der zu untersuchenden Flüssigkeit zuviel Wärme entzogen, wodurch Δ zu groß gefunden wird.
2. Zu tiefe Unterkühlung der untersuchten Flüssigkeit: Viele Flüssigkeiten lassen sich weitgehend unterkühlen, ohne daß freiwilliges Gefrieren eintritt. Erstarrt dann die zu stark unterkühlte Flüssigkeit plötzlich, so friert zuviel Eis aus, die Konzentration nimmt deshalb zu, und es wird ein tieferer Gefrierpunkt gefunden, als er der Lösung wirklich zukommt. Um diesen Fehler bei der Milch zu vermeiden, wird sie nur um etwa 0,5—0,7° unterkühlt und dann durch Einwerfen eines erbsengroßen Stückchens Eises das Gefrieren künstlich beschleunigt.
3. Zu kräftiges Rühren, wodurch Wärme entwickelt wird.

Um richtige Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig, die Fehlerquellen zu vermeiden. Es sind zur Ausführung des Verfahrens eine ganze Reihe von umständlichen Vorrichtungen vorgeschlagen worden, doch lassen sich ebenso zuverlässige und genaue Werte auch durch einfache Anwendung der gewöhnlichen Beckmann'schen Apparatur erzielen.

Beschreibung der Apparatur und Ausführung des Verfahrens.

Der von uns verwendete Apparat besteht aus folgenden Teilen:

1. Einem Beckmann'schen Thermometer.
2. Einem runden starkwandigen Kühlbad mit zugehörigem Messingrührer und passendem Deckel.
3. Einem Gefrierpunktsgefäß, bestehend aus dem oben etwas erweiterten Probierrohr mit seitlichem Stutzen.
4. Dem Rührer aus Platin von 1 mm Dicke, unten einen horizontalen Ring tragend.
5. Einer Lupe, die bequem an der Thermometerskala befestigt werden kann.
6. Einem Wasserbade, worin die zu untersuchenden Proben zuerst vorgekühlt werden können.

Die Zusammenstellung des Apparates ist aus der beigegebenen Zeichnung (Fig. 1) ohne weiteres ersichtlich.

Die Ausführung der Gefrierpunktsbestimmung gestaltet sich folgendermaßen: 30 ccm Milch werden in das Gefrierpunktsgefäß eingeführt und in dem mit Eis und wenig Wasser gefüllten Wasserbade (Fig. 2) 10—15 Minuten lang vorgekühlt. Inzwischen wird das Kühlbad mit Eisstücken von Nußgröße bis zu $\frac{3}{4}$ seines

Fig. 1.

Fig. 2.

Inhaltes angefüllt. Alsdann fügt man eine starke Handvoll Kochsalz hinzu und füllt das Kühlbad mit Brunnenwasser bis zu einer Höhe von 4—5 cm unter dem Rande auf. Nun wird mit dem Messingrührer tüchtig vermischt und die Temperatur der Kältemischung mit einem gewöhnlichen Thermometer gemessen. Sie soll zwischen -3 und -6° liegen. Ist die Temperatur zu hoch, so wird mehr Eis und Salz zugegeben; ist sie zu tief ausgefallen, so wird ein Teil der Kältemischung abgegossen und mehr Brunnenwasser hinzugefügt. Nun wird in das bereits vorgekühlte Gefrierpunktsgefäß, das die Milch enthält, der Platinrührer gebracht und auf das Ganze ein doppelt durchbohrter Stopfen, der das Beckmann'sche Thermometer trägt und den Rührer ungehindert durchtreten läßt, gesetzt. Zwecks leichter Beweglichkeit versieht man den Stopfen am besten mit einem Glasrohr, welches dem Rührerstiel als Führung dient. Es ist darauf zu achten, daß das Thermometer derart im Kork befestigt ist, daß es während der ganzen Versuchsdauer senkrecht steht und von den Wandungen des Milchgefäßes gleichmäßig entfernt ist. Man achte ferner darauf, daß beim Rühren der Platinring nicht an der Thermometerkugel schleift. Es ist derart zu rühren, daß der ringförmige Teil des Rührers die Oberfläche nahezu erreicht, aber nicht überschreitet.

Nun wird das Ganze unmittelbar in das Kühlbad eingetaucht. Die Anwendung eines Luftmantels ist ganz überflüssig. Damit das Gefrierpunkts-

gefäß im Deckel des Kühlbades gut befestigt werden kann, wird es in einem durchbohrten Kork bis zum seitlichen Stutzen eingesteckt und darauf geachtet, daß das Ganze während der Versuchsdauer senkrecht steht. Man beginnt zu rühren und zwar mit etwa 1 oder 2 Huben in der Sekunde und beobachtet das Thermometer. Der Quecksilberfaden beginnt zuerst rasch zu sinken, dann langsamer, um schließlich an einem Punkte dauernd stehen zu bleiben. Um aber einer starken Unterkühlung der Milch vorzubeugen, ist es notwendig, sobald der Quecksilberfaden etwa $0,5^{\circ}$ unter den mutmaßlichen Stand des Gefrierpunktes gesunken ist, durch den seitlichen Tubus ein Stückchen Eis in Erbsengröße einzuwerfen. Wenn die Temperatur nach dem Einführen des Eiskörnchens noch mehr als um $0,5^{\circ}$ sinkt, ist das Gefäß für ganz kurze Zeit aus dem Kühlbad herauszuheben. Nun beginnt der Quecksilberfaden plötzlich zu steigen. In diesem Augenblicke wird das Rühren unterbrochen, die Lupe am Thermometer befestigt und das Steigen der Quecksilbersäule verfolgt, wobei man von Zeit zu Zeit das Thermometer mit dem Finger anklopft. Sobald der Faden stillsteht, wird ein- bis zweimal gerührt, das Thermometer häufiger geklopft und der Stand der Quecksilbersäule abgelesen. Der bei der Milch ermittelte Skalengrad wird von dem für den

Gefrierpunkt von destilliertem Wasser bestimmten abgezogen und man erhält so die Gefrierpunktserniedrigung der Milch.

Genau unter denselben Bedingungen und Vorsichtsmaßregeln wird der Nullpunkt des Thermometers, d. h. der Stand des Gefrierpunktes bei destilliertem Wasser bestimmt. Bei einzelnen Milchuntersuchungen oder bei kleineren Reihen von 4—6 Bestimmungen genügt eine einmalige Ermittlung des Nullpunktes. Bei größeren Reihen empfiehlt es sich, am Anfang und Ende einer solchen Reihe den Gefrierpunkt des destillierten Wassers zu bestimmen.

Der Versuch kann mit der gleichen Milch wiederholt werden, vorausgesetzt, daß das eingepfulte Stückchen Eis nicht zu groß war. Zu diesem Zwecke wird das Gefrierpunktsgefäß aus dem Kühlbad herausgenommen, mit der Hand leicht erwärmt, bis alles Eis geschmolzen ist und dann wieder so verfahren, wie oben angegeben wurde.

Genauigkeitsgrad und Dauer einer Gefrierpunktsbestimmung: Es wird selten gelingen, schon bei den ersten Versuchen ganz genaue Ergebnisse zu gewinnen. Aber schon nach kurzer Übung wird es bei peinlichem Einhalten der gegebenen Vorschriften möglich sein, die Bestimmung richtig und auch schnell auszuführen. Bei Doppelbestimmungen sind gewöhnlich keine Abweichungen zu beobachten, höchstens hier und da solche von 0,001—0,003°. Ist bei einer Doppelbestimmung der Unterschied größer als 0,005°, so ist der Versuch zu verwerfen und die Bestimmung aufs neue auszuführen.

Die Flüssigkeit soll zuerst in Eiswasser vorgekühlt werden. In diesem Falle wird selbst ein Anfänger zu einer Gefrierpunktsbestimmung nicht mehr als 10 Minuten Zeit nötig haben, während man bei einiger Übung nur 5 Minuten dazu braucht. Verf. konnte wiederholt größere Reihen von 12 bis 14 Gefrierpunktsbestimmungen innerhalb einer Stunde ausführen. Bei raschem Arbeiten kann eine Bestimmung sogar in der Zeit von 3 Minuten beendet werden.

Einübung des Verfahrens und Eichung des Thermometers: Um dem Anfänger bei den ersten Versuchen eine gewisse Sicherheit zu verschaffen, sind zur Einübung des Verfahrens die verschiedenartigsten Lösungen vorgeschlagen worden mit Gefrierpunktserniedrigungen ähnlich derjenigen der Milch. So wird z. B. vorgeschlagen, die ersten Versuche mit einer Lösung von 0,9 g Chlornatrium in 100 g Wasser vom Gefrierpunkt $-0,542^{\circ}$, oder mit einer solchen von 1 g Chlornatrium in 100 g Wasser mit einem Gefrierpunkt von $-0,60^{\circ}$ zu beginnen. Auch eine Lösung von 9,495 g Saccharose in 100 g Wasser mit dem Gefrierpunkt $-0,5345^{\circ}$ ist schon empfohlen worden, desgleichen eine 2%-ige Harnstofflösung und andere mehr. Mit solchen Lösungen soll man eben die oben angeführten kryoskopischen Werte erhalten. Dabei wird offenbar vorausgesetzt, daß alle Beckmann'schen Thermometer gleich seien. Wenn auch zuzugeben ist, daß die im Handel erhältlichen, in Deutschland angefertigten Beckmann'schen Thermometer durch hohe Genauigkeit sich auszeichnen, so ist doch kaum anzunehmen, daß sie alle völlig gleich sind. Jedes Thermometer muß zuerst geprüft, d. h. geeicht werden. Dies geschieht folgendermaßen:

Die grundlegende Beziehung für die Kryoskopie nach Raoult

$$M = \frac{K \cdot g}{\Delta G}$$

ist weiter oben schon dargelegt worden. Aus ihr folgt

$$K = \frac{M \cdot \Delta \cdot G}{g}.$$

Geht man von einem Stoff mit genau bekanntem Molekulargewicht aus, so läßt sich K auf experimentellem Wege ermitteln, da Δ , G und g unmittelbar bestimmt werden können. Raoult hat zuerst durch den Versuch K für Wasser zu 1850 gefunden. Van't Hoff hat diesen Wert nach der weiter oben ebenfalls schon dargelegten Formel

$$K = \frac{2 \cdot T^2}{W}$$

ermittelt. Durch Anwendung dieser Formel findet man für Wasser

$$K = \frac{2 \cdot 273^2}{79,25} = 1880,8.$$

Nach dieser Formel ist K eine Größe, die von zwei Konstanten, der absoluten Schmelztemperatur und der latenten Schmelzwärme des Lösungsmittels abhängig ist; sie sollte eigentlich selbst eine Konstante sein. Schlägt man aber in verschiedenen Tabellen nach, so findet man für K verschiedene Werte angegeben, so z. B.

Chemiker-Kalender 1916	19,0
Allgemeine und physikalische Chemie in der Sammlung Götschen 1898, S. 67	18,5
Ostwald-Luther, Physikochemische Messungen 1910, S. 278	1,86
Landolt-Börnstein, Physikalisch-chemische Tabellen 1905, S. 501	18,4—18,6
Stöcklin a. a. O.	1894,6

Schon diese kurze Zusammenstellung zeigt, wie verschieden die Werte sind, die für K angegeben werden. Um eine Vereinheitlichung der Ergebnisse in der Kryoskopie zu erzielen, hat Stöcklin einen sehr brauchbaren Vorschlag gemacht, nämlich K zu 1900 zu setzen, also zu einem Wert, der dem von van't Hoff berechneten sehr nahe ist. Alle durch den Versuch ermittelten Werte sollen unter Zugrundelegung der Beziehung $K = 1900$ berechnet werden. Bleiben die Arbeitsweise und die Apparatur gleich, so kann uns diese Konstante dazu dienen, die ermittelten Werte zu korrigieren, sozusagen die Apparatur zu „eichen“, sodaß die erhaltenen korrigierten Werte auch mit den von anderen Forschern an anderen Apparaten ermittelten verglichen werden können.

Zu diesem Zwecke genügt es, mit der größtmöglichen Genauigkeit die Lösung von genau bekannter Konzentration eines Stoffes, welcher folgenden Anforderungen entsprechen muß, auf ihren Gefrierpunkt zu prüfen:

1. Der Stoff muß chemisch rein und seine Konstitutionsformel genau bekannt sein.
2. Die betreffende Verbindung soll kein Elektrolyt sein, soll nicht dissoziieren, soll keine Kryohydrate bilden und unter den Versuchsbedingungen der Gefrierpunktsbestimmung nicht polymerisieren.

Der Harnstoff entspricht diesen Anforderungen und wir haben nach dem Vorschlage von Stöcklin eben diese Verbindung benutzt. Chemisch reiner Harnstoff von Kahlbaum wurde zunächst im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und davon 5 g auf der analytischen Wage genau abgewogen. Diese Menge wurde in einem geeichten Kölbchen von 250 ccm mit destilliertem Wasser bei 15° in Lösung gebracht und die Lösung zur Marke aufgefüllt. Man erhält so eine genau 2 0/0-ige Harnstofflösung. Von derselben wurde bestimmt:

1. Das spezifische Gewicht auf pyknometrischem Wege; 2. Die Refraktion bei 15°; 3. Die Gefrierpunktserniedrigung in 8 aufeinander folgenden Versuchen.

Es ergaben sich dabei die folgenden Werte:

Spezifisches Gewicht bei 15° . . . 1,0056;

Refraktion bei 15° 23 Skalenteile des Eintauchrefraktometers.

Daraus ergibt sich n_D^{15}) . . . 1,33628.

Gefrierpunktserniedrigung $\Delta = -0,645; -0,648; -0,645; -0,645; -0,647; -0,645; -0,647; -0,645$; in Mittel $-0,646$.

Das spezifische Gewicht und die Refraktion unserer 2%-igen Harnstofflösung stimmen mit den von Stöcklin an einer solchen Lösung ermittelten genau überein, nur der Gefrierpunkt weicht um einen geringen Betrag ab, indem wir Δ als Mittel aus 8 Versuchen zu $-0,646$, dagegen Stöcklin zu $-0,643$ fand.

Auf Grund der erhaltenen Werte soll nun K ermittelt werden. Wie schon oben angeführt wurde, ist

$$K = \frac{M \cdot \Delta \cdot G}{g} \quad (1)$$

Da die von uns verwendete Harnstofflösung von bestimmter Konzentration, nämlich 2%-ig war, läßt sich G , d. h. das Gewicht des Lösungsmittels aus dem spezifischen Gewicht S der Lösung nach folgender Formel berechnen:

$$G = S \cdot V - g \quad (2)$$

wobei bedeutet:

S = Spezifisches Gewicht der Lösung,

V = Volumen der Lösung und

g = die Menge des gelösten Stoffes.

Setzen wir in die Formel (1) den Wert für G nach (2) ein, so erhalten wir

$$K = \frac{M \cdot \Delta \cdot (S \cdot V - g)}{g}$$

oder

$$K = \frac{60 \cdot 0,646 (1,0056 \cdot 100 - 2)}{2} = 1912.$$

Diese Konstante stimmt nahezu mit der von Stöcklin vorgeschlagenen von 1900 und der von van't Hoff berechneten überein. Selbstverständlich ist die für unsere Apparatur gültige Konstante nicht absolut unveränderlich und muß von Zeit zu Zeit festgestellt und besonders bei wissenschaftlichen Arbeiten immer angegeben werden. Denn nur auf Grund dieser Konstante können, wie schon gesagt, Werte, die von verschiedenen Forschern erhalten wurden, miteinander verglichen werden. Hat man bei einer Milch $\Delta = 0,55^\circ$ gefunden und die Apparatenkonstante K beträgt 1912, so wird dieselbe Milch bei einer Konstante von 1860 folgenden Wert für Δ aufweisen

$$0,55 : 1912 = x : 1860; \quad x = \frac{0,55 \cdot 1860}{1912} = 0,535^\circ.$$

Ohne Angabe der Konstante ist der erste Wert $\Delta = 0,55^\circ$ normal, der zweite $\Delta = 0,535^\circ$ verdächtig. In Wirklichkeit aber sind beide Werte untereinander gleich;

¹⁾ B. Wagner, Über quantitative Bestimmungen wässriger Lösungen mit dem Zeißschen Eintauchrefraktometer. Dissertation. Jena 1903. S. 62.

es müssen nur die entsprechenden Konstanten berücksichtigt werden. Für die tägliche Laboratoriumspraxis ist die Kenntnis der Konstante nicht von so großem Werte, denn es werden ja nur die Differenzen zweier Bestimmungen in Betracht gezogen, nämlich derjenigen der verdächtigen Milch und derjenigen der Vergleichsprobe. Diese Differenz wird bei Konstanten, die nur um so wenig von einander abweichen, wie in unserem Beispiele angegeben ist, durch Umrechnung kaum nennenswert geändert. Da unsere Konstante mit dem von Stöcklin vorgeschlagenen mittleren Wert 1900 genügend übereinstimmt, wurde davon Umgang genommen, auf letzteren Wert umzurechnen.

Berechnung der Menge des zugesetzten Wassers: Von der Erwägung ausgehend, daß das Sinken des Gefrierpunktes dem Wasserzusatz nahezu proportional ist, hat Winter für die Berechnung des letzteren folgende Formel aufgestellt:

$$x = V \frac{A - A_1}{A}.$$

x ist das Volumen Wasser im Volumen V der in Untersuchung genommenen Milch. A ist die Gefrierpunktserniedrigung der normalen und A_1 diejenige der gewässerten Milchprobe. Nach dieser Formel läßt sich der Grad der Wässerung aus der Gefrierpunktserniedrigung in gleicher Weise in Prozenten berechnen, wie es für die Ermittlung des Wasserzusatzes aus den Differenzen in der fettfreien Trockensubstanz geschieht.

Unter der Annahme, daß die mittlere Gefrierpunktserniedrigung einer normalen Milch $0,55^\circ$ betrage, berechnet sich der Wasserzusatz nach folgender Formel:

$$x = 100 - \frac{100 \cdot A}{0,55}.$$

Diese Formel ist nicht als völlig genau zu betrachten, denn man läßt dabei außer acht, daß durch Wasserzusatz die elektrolytische Dissoziation verändert wird und noch mehr Salze in Lösung gehen, was beides eine Erniedrigung des Gefrierpunktes bedingt. Allerdings handelt es sich hierbei um geringe Beträge, die in der Praxis ganz außer acht gelassen werden können. Ferner ist noch folgendes zu berücksichtigen. In der Praxis wird ja nur in seltenen Fällen destilliertes Wasser, z. B. Regenwasser, der Milch zugesetzt werden; in der Regel wird es sich um Brunnen- oder sonstiges Trinkwasser handeln, das eine gewisse Härte besitzt, die durch die Menge der gelösten Salze bedingt ist. Ein solches Wasser wird aber an und für sich eine bestimmte Gefrierpunktserniedrigung aufweisen. Gelegentlich wurden von uns bei verschiedenen Wasserproben unseres Kantones Gefrierpunktsbestimmungen ausgeführt, wobei die Beobachtung gemacht werden konnte, daß im allgemeinen ein Wasser, welches 400 mg Trockenrückstand vom Liter ergibt, eine Gefrierpunktserniedrigung von $0,02^\circ$ aufweist. Werden zu einer Milch 10 Prozent eines solchen Wassers hinzugesetzt, so wird man nach obiger Formel vielleicht nur einen Zusatz von 9,5% berechnen. Es müßte also bei der zahlenmäßigen Ermittlung des Wasserzusatzes auch noch auf die Härte des zugesetzten Wassers Rücksicht genommen und eine entsprechende Korrektur angebracht werden. Für die Praxis ist das aber gewiß nicht von großer Wichtigkeit, besonders wenn man den Umstand berücksichtigt, daß auch bei normaler Milch der Gefrierpunkt zwischen $-0,54$ und $0,56^\circ$ schwanken kann.

Es erscheint deshalb seltsam, wenn Winter in seiner Tabelle zur Ermittlung der Wassermenge, die der Milch zugesetzt worden ist, auf Grund des Gefrierpunktes

den Prozentgehalt an Wasser auf zwei Dezimalen genau angibt, wo doch schon die erste Dezimale mit Fehlern behaftet ist. Überhaupt muß es auffallend erscheinen, wenn in einem Nahrungsmittel mit einem normalen Wassergehalt von 87—88% die Menge des zugesetzten Wassers auf hundertstel Prozente genau angegeben wird. Es ist das eine etwas übertriebene Scheingenauigkeit. Den Wasserzusatz auf ganze Prozente anzugeben, dürfte völlig genügen.

Fig. 3.

Nachweis einer Milchwässerung durch den Gefrierpunkt.

Um die Berechnung des Wasserzusatzes nach obiger Formel zu ersparen, findet sich vorstehend eine graphische Darstellung (Fig. 3) wiedergegeben, aus welcher auf Grund des ermittelten Gefrierpunktes der zugehörige Wasserzusatz in Prozenten ohne weiteres abgelesen werden kann. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, daß die ursprüngliche Milch bei 7 Säuregraden einen Gefrierpunkt von $-0,55^{\circ}$ aufwies.

Fig. 4.

Beeinflussung des Gefrierpunktes der Milch durch zunehmende Säuerung.

In einer zweiten graphischen Darstellung (Fig. 4) wird die Beeinflussung des Gefrierpunktes einer normalen Milch durch zunehmende Säuerung zum Ausdruck gebracht. Aus derselben graphischen Darstellung können auch ohne weiteres die Gefrierpunktserniedrigungen für 1—15 Säuregrade abgelesen werden.

Wie schon oben gezeigt wurde, wird auch durch Zusatz von Konservierungsmitteln der Gefrierpunkt beeinflusst. Es möge an Hand zweier Beispiele die Berechnung des Wasserzusatzes unter Berücksichtigung des Einflusses von Säuregrad und Konservierungsmittel gezeigt werden.

1. Eine Milch, mit 1‰ Formol konserviert, zeigt bei einem Säuregrad von 6,0 nach Soxhlet-Henkel die Gefrierpunktserniedrigung	— 0,46
Korrektur für 7,0—6,0 = 1,0 Säuregrade	+ 0,008
Korrektur für Zusatz von 1‰ Formol	— 0,030
Gefrierpunktserniedrigung der nicht konservierten Milch bei 7 Säuregraden	— 0,438
Für die Gefrierpunktserniedrigung von — 0,44 (oder $\Delta \cdot 10^2 = 44$) ergibt sich aus der graphischen Darstellung (Fig. 3) ein Wasserzusatz von . .	20 %
2. Eine nicht konservierte Milch zeigt bei 12,0 Säuregraden eine Gefrierpunktserniedrigung von	— 0,535
Korrektur für 12,0—7,0 = 5,0 Säuregrade zu je 0,008	+ 0,040
Gefrierpunktserniedrigung der Milch bei 7 Säuregraden	— 0,495
Für die Gefrierpunktserniedrigung von — 0,495 (oder $\Delta \cdot 10^2 = 49,5$) ergibt sich aus der graphischen Darstellung (Fig. 3) ein Wasserzusatz von . .	10 %

Einfluß der Nahrung und des Hungerns der Kühe auf den Gefrierpunkt der Milch.

Hie und da wird behauptet, es könnte durch verschiedene Zusätze, wie Kochsalz, Glycerin, Soda, Formalin, Zucker usw. der Gefrierpunkt der Milch beeinflusst und somit ein stattgehabter Wasserzusatz künstlich verdeckt werden. Dieser Umstand wird als schwacher Punkt der Kryoskopie betrachtet. Abgesehen davon, daß solche Zusätze in der Praxis sehr unwahrscheinlich sind, da sie mit Leichtigkeit durch die chemische Analyse aufgedeckt werden können, beeinflussen dieselben nicht nur den kryoskopischen, sondern auch den refraktometrischen Befund. Sodann aber sind solche Zusätze bei den Preisen der Milch überhaupt nicht lohnend und schon aus diesem Grunde unwahrscheinlich. Eine andere Frage ist es, ob nicht vor der Erhebung einer Stallprobe der Viehbesitzer durch das Futter, durch Hungernlassen oder durch reichliches Tränken seines Viehstandes oder sonstwie den Gefrierpunkt der zu melkenden Milch beeinflussen könne. F. M. von der Laan hat in seiner verdienstvollen Arbeit „Das osmotische Gleichgewicht zwischen Blut, Milch und Galle“¹⁾ diese Frage nebenbei beantwortet. Es sei hier einiges von seinen interessanten Versuchen angeführt.

Einfluß der Nahrung bezw. des Hungerns auf den Gefrierpunkt der Milch: Eine Kuh, die wenigstens 24 Stunden hungerte, wird gemolken und bekommt dann während 24 Stunden wiederum keine Nahrung. Darauf wird sie wieder gemolken. Die Untersuchung der Milch lieferte folgende Ergebnisse:

Gefrierpunkt der Milch

Die Kuh hat wenigstens 24 Stunden gehungert . . . = 0,545°

„ „ „ „ 2 × 24 „ „ . . . = 0,541°.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß die Aufnahme von Nahrung die Gefrierpunktserniedrigung der Milch nicht beeinflusst. Auch das Hungern während einiger Tage übt keine Wirkung auf den Gefrierpunkt der Milch aus.

Von der Laan versuchte ferner die interessante Frage zu beantworten, ob es nicht auf physiologischem Wege, vom Darmkanale aus, möglich ist, den Gefrierpunkt der Milch zu beeinflussen. Zu diesem Zwecke wurde folgender Versuch angestellt:

¹⁾ Biochem. Zeitschrift 1915, 71, 289.

Eine Kuh, die wenigstens 24 Stunden gehungert hatte, wurde um 10 $\frac{1}{2}$ Uhr morgens gemolken. Um 12 Uhr wurden ihr per os 16 Liter, per rectum 20 Liter Wasser eingegossen. Hiervon flossen 3 Liter Wasser ab. Eine Stunde später wurde die Kuh wieder gemolken. Um 3 $\frac{1}{2}$ Uhr wurde ihr von neuem Milch entnommen, worauf sie bis 11 $\frac{1}{2}$ Uhr des folgenden Tages ohne jede Nahrung blieb und dann nochmals gemolken wurde. Die Kuh fühlte sich, nachdem ihr das Wasser eingegossen war, sichtbar unbehaglich. Sie schauderte, die Haut war kalt, die Körpertemperatur war mit 38° aber normal. Die Gefrierpunktsbestimmungen der Milch ergaben die folgenden Werte:

Zeit	Verhältnisse	Gefrierpunkt der Milch
10 $\frac{1}{2}$ Uhr	Die Kuh hat mindestens 24 Stunden gehungert	0,537°
12 $\frac{3}{4}$ „	$\frac{1}{2}$ Stunde vorher sind der Kuh 33 Liter Wasser eingegossen worden	0,536—0,54°
3 $\frac{1}{2}$ „	—	0,521—0,523°
11 $\frac{1}{2}$ „ des folgenden Tages	Die Kuh wurde seit der Wasseraufnahme weder gefüttert noch getränkt	0,534°

Die gezwungene Aufnahme von so vielem Wasser hat also nur eine ganz geringe Veränderung des Gefrierpunktes der Milch bewirkt.

In einem weiteren Versuche wurde einer Kuh, die mindestens 48 Stunden gehungert hatte, nach dem Melken 1 kg Glaubersalz, in 2 Liter Wasser gelöst, eingegeben. Dann wurden ihr 3 $\frac{1}{2}$ und 5 $\frac{1}{2}$ Stunden später Blut und Milch entnommen. Nach 12 Stunden bekam die Kuh heftigen Durchfall. Nach weiteren 22 Stunden wurden ihr aufs neue Blut und Milch entnommen, sie bekam dann Heu und Wasser, wovon sie 45 Liter aufnahm. Weitere 5 $\frac{1}{2}$ Stunden später wurde sie von neuem gemolken. Die Bestimmung der Gefrierpunkte ergab:

Zeit	Verhältnisse	Gefrierpunkt der Milch
3 Uhr nachm.	—	0,577°
5 „ „	—	0,582°
9 $\frac{1}{2}$ Uhr vorm.	Die Kuh nimmt 45 Liter Wasser auf und bekommt Heu	0,585°
3 $\frac{1}{2}$ Uhr nachm. des folgenden Tages	—	0,54°

Durch die Glaubersalzgabe wurde eine sehr deutliche Zunahme der Blutkonzentration verursacht, womit jedoch eine ganz gleiche Vergrößerung der Gefrierpunktserniedrigung der Milch Schritt hielt. Nach Wasseraufnahme erholt sich die Kuh innerhalb einiger Stunden und die Gefrierpunktserniedrigung der Milch erscheint normal. Wiewohl es also möglich ist, vom Darm aus mittels starker Gaben von Wasser oder von Salz den Gefrierpunkt der Milch zu beeinflussen, so sind doch die dadurch hervorgerufenen Abweichungen unter Berücksichtigung der ganz außergewöhnlichen Verhältnisse, die wohl kaum in der Praxis angewendet werden dürften, als recht gering zu bezeichnen.

Aus diesen Versuchen folgt, daß der Gefrierpunkt der Milch von den zeitweiligen Nahrungsverhältnissen des Tieres unabhängig ist. Auch das Hungern während einiger Tage übt auf den Gefrierpunkt keinen Einfluß aus. Wohl ist es möglich,

durch erzwungene Verdünnung des Darminhaltes bzw. durch starke Glaubersalzgabe den Gefrierpunkt der Milch zu beeinflussen. Die Abweichungen sind aber als sehr klein zu bezeichnen.

Die Gefrierpunktsbestimmung ist also ein sicheres und genaues Mittel zur Ermittlung eines Wasserzusatzes bei der Milch.

Zur Refraktometrie des Milchserums.

Durchgeht man die älteren Arbeiten über die Refraktometrie des Milchserums, so findet man nur wenige anerkennende, meist aber zweifelnde und absprechende Urteile über dieses Verfahren. Man wird nicht weit fehlgehen, wenn man diese letzteren Urteile auf die verschiedenartige Beschaffenheit der zur Untersuchung verwendeten Sera zurückführen wird, denn alle früheren Verfahren der Serumbereitung durch freiwillige Gerinnung, durch Essigsäure, sowie durch Labgerinnung können nicht als einwandfrei betrachtet werden, da das erhaltene Serum nicht immer gleichmäßig ausfiel.

Dagegen hat uns Ed. Ackermann ein ausgezeichnetes Verfahren in die Hand gegeben, das die Gewinnung eines gleichmäßig zusammengesetzten Serums für refraktometrische Zwecke ermöglicht. In bezug auf Genauigkeit und Sicherheit der Ergebnisse, sowie Einfachheit und Schnelligkeit der Ausführung entspricht dieses Verfahren allen Anforderungen, die man an ein solches stellen kann. Gewiß ist auch diese Arbeitsweise am Anfang, wenn auch von einer Minderheit, pessimistisch beurteilt worden. Allein nach den grundlegenden Untersuchungen von Mai und Rothenfußer¹⁾, ferner nach der klassischen Arbeit von Wiegner²⁾, der die Gleichmäßigkeit und die Konstanz des Chlorcalciumserums auf Grund chemisch-physikalischer Untersuchungen zuerst begründet und erwiesen hat, sind solche Stimmen des Mißtrauens immer seltener geworden. Nach dem, was bis jetzt in der Literatur bekannt geworden ist, scheint die Refraktometrie des Chlorcalciumserums fast in allen Laboratorien Deutschlands und der Schweiz sich eingebürgert zu haben, und der von Mai ausgesprochene Wunsch, es möchten bald die verschiedenen Spontanseren, Essigsäuresera und dergleichen aus der Laboratoriumspraxis verschwinden, scheint ebenfalls in Erfüllung gegangen zu sein. Unsere Betrachtungen beziehen sich ausschließlich auf das Chlorcalciumserum, dessen Darstellung nach Ackermann als bekannt vorausgesetzt wird.

Die Versuche von Mai und Rothenfußer haben gezeigt, daß, wenn man bei der Herstellung des Chlorcalciumserums gleichmäßig und sorgfältig arbeitet, es nach der Vorschrift von Ackermann möglich ist, einen annähernd gleichbleibenden Anteil der kolloidalen Milchbestandteile auszuflocken, so daß die Trockenmasse des Chlorcalciumserums nur in engen Grenzen schwankt. In seiner Arbeit gibt Wiegner die mittlere Zusammensetzung des Chlorcalciumserums, wie folgt, an:

Wasser	93,85 %
Eiweiß	0,30 „
Milchzucker	5,20 „
Asche	0,55 „
Citronensäure	0,10 „

¹⁾ Diese Zeitschrift 1908, 16, 8.

²⁾ Diese Zeitschrift 1910, 20, 70.

Der mittlere Gehalt an Trockensubstanz beträgt also 6,15⁰/. Es war sehr einladend, die außerordentliche Konstanz des Chlorcalciumserums in Beziehung zu anderen Milchbestandteilen zu bringen. Wiegner hat auf Grund des sehr umfangreichen Materials, das Mai und Rothenfußer in ihrer Abhandlung „Beiträge zur Kenntnis der Lichtbrechung des Chlorcalciumserums“ geliefert haben, folgendes Verhältnis zwischen der Trockensubstanz des Chlorcalciumserums und der fettfreien Trockensubstanz der Milch aufgestellt:

$$\frac{\text{Fettfreie Trockenmasse der Milch}}{\text{Trockenmasse des Chlorcalciumserums}} = \text{Constans} = 1,4054.$$

Die Trockenmasse (t) des Chlorcalciumserums läßt sich folgendermaßen nach Wiegner berechnen:

1. Aus dem spezifischen Gewicht des Chlorcalciumserums, bestimmt bei 20⁰ und bezogen auf Wasser von 4⁰, nach der Formel:

$$t = 245,36 - 244,92 \frac{1}{d_{20/4}}.$$

2. Aus dem Brechungsexponenten des Serums bei 20⁰ nach der Formel:

$$t = 245,36 - \frac{N^2 + 2}{N^2 - 1} = 50,405,$$

wobei bedeutet

d = Dichte des Chlorcalciumserums,
N = Brechungsexponent.

Nachdem sich so verschiedene Beziehungen zwischen der Trockenmasse der Milch und dem Chlorcalciumserum ergeben haben, war es nicht ohne Interesse, zu prüfen, ob auch ein Zusammenhang zwischen dem Gefrierpunkt der Milch und der Refraktion des Serums bestehe. Auf Grund eines umfangreichen Materials von etwa 400 Stallproben und ebensovielen Marktmilchproben, die nach der chemischen Untersuchung als normal zu beurteilen waren und Refraktionszahlen von 38—41 sowie Gefrierpunktserniedrigungen von 0,54—0,56⁰ aufwiesen, kann allgemein gesagt werden, daß einer normalen Refraktionszahl von 38—41 bei unverfälschter Milch auch ein normaler Gefrierpunkt von 0,54—0,56⁰ entspricht. Bei Wasserzusatz waren beide Werte, Refraktionszahl und Gefrierpunkt, entsprechend herabgesetzt. Dagegen war das Umgekehrte nicht immer der Fall, d. h. nicht immer entsprach einer Refraktionszahl von unter 38 bei unverfälschter Milch auch ein abnormer Gefrierpunkt. Bei einer ganzen Reihe von Stallproben wurde neben einer abnorm niedrigen Refraktionszahl ein normaler oder annähernd normaler Gefrierpunkt ermittelt.

In der nachfolgenden Tabelle finden sich diese Fälle zusammengestellt, wobei der Übersichtlichkeit wegen nur die Refraktionszahl, die fettfreie Trockenmasse und der Gefrierpunkt angeführt sind.

Nr.	Bezeichnung	Refraktions- zahl	Fettfreie Trocken- masse	Gefrierpunkt $\Delta \cdot 10^2$	Bemerkungen
1	Hüttenmilch	37,0	8,49	55,0	—
2	Stallprobe (zugehörige) .	37,2	8,81	55,5	—
3	Hüttenmilch	36,3	8,70	54,0	—
4	Stallprobe (zugehörige) .	36,5	8,90	55,0	—
5	"	37,4	8,77	55,0	—
6	Hüttenmilch	37,0	8,57	53,5	—
7	Stallprobe (zugehörige) .	37,3	8,70	53,0	—
8	"	36,0	8,29	54,0	Katalasezahl = 70
9	Hüttenmilch	36,5	8,11	55,0	" = 60
10	Stallprobe (zugehörige) .	36,0	7,83	54,0	" = 53
11	"	37,5	8,46	53,0	—
12	"	36,5	8,09	58,0	" = 130 Leukozytenprobe 3,2 ⁰ / ₁₀₀ , salziger Geschmack
13	"	37,4	8,33	54,0	Katalasezahl = 120, Leukozytenprobe 5,0 ⁰ / ₁₀₀
14	"	33,7	7,24	53,0	Katalasezahl = 91, Leukozytenprobe 1,0 ⁰ / ₁₀₀
15	"	34,4	7,60	54,5	Katalasezahl = 90, Leukozytenprobe 0,6 ⁰ / ₁₀₀
16	" I	37,9	8,42	55,0	—
17	" II	37,0	8,38	54,5	—
18	"	37,7	8,46	53,0	—
19	"	38,0	7,85	55,0	Fettgehalt 7,0%
20	"	37,8	7,97	53,0	—
21	Hüttenmilch	37,0	8,10	55,0	—
22	Stallprobe (zugehörige) .	37,2	8,18	55,0	Katalasezahl = 83, Leukozytenprobe 2,1 ⁰ / ₁₀₀
23	Hüttenmilch	38,0	8,52	54,0	—
24	Stallprobe (zugehörige) .	38,0	8,47	54,0	—
25	"	37,7	8,59	54,5	—
26	"	34,3	7,44	53,0	Katalasezahl = 70
27	"	37,4	8,53	53,0	—
28	"	37,6	8,70	53,0	—
29	" (1 Kuh) . .	33,5	7,45	47,5	Katalasezahl = 160, Leukozytenprobe über 2 ⁰ / ₁₀₀
30	"	37,9	8,69	54,5	—
31	"	36,5	8,04	53,0	Katalasezahl = 80
32	"	37,6	8,16	53,5	" = 43
33	"	36,6	8,57	54,5	" = 65
34	"	36,7	8,04	54,0	" = 84
35	"	37,6	0,65	54,5	" = 32

Sämtliche in dieser Zusammenstellung angeführten Marktmilchproben waren, wie die zugehörigen Stallproben beweisen, unverfälscht. Die Refraktionszahl aller dieser

Markt- und Stallproben sind abnorm niedrig, ähnlich wie bei Milchproben, die eine Wässerung erfahren haben. Bei einigen der in der Tabelle angeführten Beispiele deuteten die hohen Katalasezahlen und die Leukozytenprobe daraufhin, daß es sich dabei um Milch kranker Kühe handelt. Andere Proben hingegen waren aber auch nach den Ergebnissen der biologischen Untersuchung als normal zu betrachten. Der Umstand, daß es unverfälschte Milch geben kann mit einer Refraktionszahl von weit unter 38, gab manchem Analytiker Veranlassung, den Wert der Refraktometrie für die Milchbeurteilung in Zweifel zu ziehen. In solchen Fällen aber, wo die Refraktionszahl ungewöhnlich tief steht, die Milch indessen unverfälscht ist, besitzen wir in der Gefrierpunktserniedrigung eine Konstante, die uns zu dem Schlusse berechtigt, daß keine gewässerte Milch vorliegt. Aus der gebrachten Zusammenstellung sehen wir, daß trotz der ungewöhnlich niedrigen Refraktionszahl und trotz dem ungewöhnlich niedrigen Gehalt an fettfreier Trockensubstanz der osmotische Druck und somit die Gefrierpunktserniedrigung nicht verändert wurden. Wie sich dies erklären läßt, davon soll weiter unten die Rede sein. Nur bei der Milch Nr. 29 ist neben der Refraktionszahl und der fettfreien Trockensubstanz auch der Gefrierpunkt abnorm niedrig. Diese Milch zeigt aber zugleich die höchste von uns je beobachtete Katalasezahl. Wie spätere Nachforschungen ergaben, handelte es sich um Milch von einer hochgradig tuberkulösen Kuh.

In den angeführten Beispielen zeigt sich auch die Überlegenheit der Kryoskopie gegenüber der Refraktometrie. Daraus folgt aber weiter, daß wenn der Analysenbefund bei einer Milch noch so ungewöhnlich und die Refraktion noch so abweichend sein mag, der Gefrierpunkt aber normal ist, dann ohne weiteres angenommen werden darf, daß eine unverfälschte Milch vorliegt.

Selten werden ja Stallproben von dem begutachtenden Chemiker persönlich erhoben; meistens geschieht es durch besonders für diesen Zweck ausgebildete Beamte. In den Fällen, wo die Untersuchungsergebnisse und besonders die Refraktionszahl, die fettfreie Trockensubstanz usw. die abnorme Zusammensetzung einer Stallprobe ergeben, ist es für den Begutachter eine Beruhigung, wenn er aus der Gefrierpunktserniedrigung ersehen kann, daß die Probe richtig erhoben worden ist, denn bei Kühen, die nicht hochgradig krank sind, scheint der Gefrierpunkt der Milch innerhalb viel engerer Grenzen zu schwanken als die Refraktionszahl.

Kryoskopie des Chlorkalciumserums.

Das Chlorkalciumserum ist, vom Standpunkte der Kryoskopie betrachtet, nichts anderes als eine verdünnte Lösung von Milchzucker, Salzen, geringen Mengen Eiweiß und Citronensäure in Wasser, und es gelang bereits Wiegner, eine ganze Reihe von interessanten Beziehungen zwischen den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Bestandteile gerade des Ackermann'schen Chlorkalciumserums aufzudecken. Da sich die sehr verdünnten Krystalloide des Chlorkalciumserums den allgemeinen van't Hoff'schen Gesetzen für verdünnte Lösungen unterordnen, so müssen sich, wie Wiegner es vermutet, für die elektrische Leitfähigkeit, den osmotischen Druck, Gefrierpunkt, Siedepunkt usw. des Chlorkalciumserums Gesetzmäßigkeiten zeigen, die aus dessen chemischer Zusammensetzung hergeleitet werden können. Da ferner die chemische Zusammensetzung des Chlorkalciumserums mit derjenigen der Milch, aus der das Serum hergestellt wurde, in Beziehung steht, so würden dahingehende

Untersuchungen in verschiedener Hinsicht theoretisches und praktisches Interesse bieten. Ich stellte mir daher die Aufgabe, einige Versuche nach dieser Richtung anzustellen, die in der Tat zu verschiedenen interessanten Aufschlüssen führten.

Vor allem wurde versucht, die Gefrierpunktserniedrigung und die Erhöhung der in Skalenteilen des Zeiß'schen Eintauchrefraktometers ausgedrückten Refraktionszahl zu bestimmen, die die entsprechenden Mengen der Chlorcalciumlösung nach Ackermann in reinem destilliertem Wasser hervorrufen. Zu diesem Zwecke wurden je 30 ccm Wasser mit 0,25 bzw. 0,50 ccm der 15 %-igen Chlorcalciumlösung nach Ackermann versetzt, gut durchgemischt und die Gefrierpunktserniedrigung und Refraktionszahl dieser Lösungen bestimmt. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengestellt:

Refraktion des Wassers bei $17,5^{\circ} = 15$ Skalenteile des Eintauchrefraktometers von Zeiß.

Lösung von	Gefrierpunkts- erniedrigung	Refraktion der Lösung bei $17,5^{\circ}$ (Skalenteile des Eintauch- refraktometers)		Erhöhung der Refraktion (Skalenteile)
0,25 ccm Chlorcalciumlösung (15 %) in 30 ccm Wasser	— $0,070^{\circ}$; — $0,073^{\circ}$	15,7	15,8	0,75
0,83 ccm Chlorcalciumlösung (15 %) in 100 ccm Wasser	$0,075^{\circ}$	15,7	15,7	0,70
0,50 ccm Chlorcalciumlösung (15 %) in 30 ccm Wasser	— $0,140^{\circ}$; — $0,145^{\circ}$	16,4	16,4	1,40

Darauf wurden je 30 ccm Milch mit 0,25 bzw. 0,50 ccm der 15 %-igen Chlorcalciumlösung nach Ackermann versetzt, gut durchgemischt und darin, ohne vorher zu erwärmen, der Gefrierpunkt bestimmt. Milchproben, die vor dem Zusatz von Chlorcalcium einen Gefrierpunkt von $0,54$ bis $0,55^{\circ}$ zeigten, ergaben nach Zusatz von Chlorcalcium in den oben angegebenen Mengen Gefrierpunktserniedrigungen von $0,615$ bis $0,62^{\circ}$ bzw. $0,68$ bis $0,69^{\circ}$.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden je 100 ccm einer Milch von normaler Zusammensetzung und von 7,0 Säuregraden nach Soxhlet-Henkel mit verschiedenen Mengen der Chlorcalciumlösung nach Ackermann versetzt und genau nach seinem Verfahren behandelt. In dem so gewonnenen Chlorcalciumserum wurde neben der Refraktion auch der Gefrierpunkt bestimmt. Im folgenden sind die Ergebnisse zusammengestellt:

100 ccm Milch wurden versetzt mit 15 %-iger Chlorcalciumlösung	Gefrierpunkt des Serums	Refraktions- zahl des Serums	100 ccm Milch wurden versetzt mit 15 %-iger Chlorcalciumlösung	Gefrierpunkt des Serums	Refraktions- zahl des Serums
0,85 ccm	— $0,585^{\circ}$	39,3	3,40 ccm	— $0,780^{\circ}$	41,40
1,70 "	— $0,650^{\circ}$	39,95	4,20 "	— $0,850^{\circ}$	42,20
2,55 "	— $0,715^{\circ}$	40,65	5,00 "	— $0,920^{\circ}$	43,0

Aus diesen Versuchen ergibt sich:

1. daß durch den Zusatz von 0,25 ccm 15⁰/o-iger Chlorcalciumlösung zu 30 ccm Wasser die Gefrierpunktserniedrigung im Mittel $-0,075^0$ beträgt und die Refraktionszahl im Mittel um 0,7 Skalenteile erhöht wird; durch stärkere Zusätze werden diese Werte entsprechend erhöht;
2. daß durch Zusatz von 0,25 bzw. 0,50 ccm der 15⁰/o-igen Chlorcalciumlösung zu 30 ccm Milch der Gefrierpunkt derselben von $-0,54$ auf $-0,61$ bis $-0,62$ bzw. $-0,69^0$ gebracht wird;
3. daß, wenn die mit Chlorcalciumlösung versetzte Milch nach Ackermann behandelt wird, der Gefrierpunkt des gewonnenen Chlorcalciumserums niedriger ist als die Summe der Gefrierpunktserniedrigungen der zur Darstellung des Serums benutzten Milch und der zugesetzten Chlorcalciummenge;
4. daß die Gefrierpunktserniedrigung des Chlorcalciumserums um 0,02 bis 0,03⁰ und im Mittel um 0,025⁰ von der Summe der Gefrierpunktserniedrigungen der Milch und der Chlorcalciummenge abweicht.

Oder mit anderen Worten, das Chlorcalciumserum weist gegenüber der Milch eine Abweichung in der Gefrierpunktserniedrigung von 0,04 bis 0,05 und im Mittel von 0,045⁰ auf. Würden beim Kochen der Milch mit der Chlorcalciumlösung keine chemischen Reaktionen sich abspielen, so müßte diese Differenz 0,07⁰ betragen, also gleich der Gefrierpunktserniedrigung des Chlorcalciums im Wasser sein. Es findet aber bei der Darstellung des Chlorcalciumserums eine Verminderung der Gefrierpunktserniedrigung um rund 0,025⁰, nämlich um 0,615—0,59⁰ statt. Dieser Befund scheint deshalb eine gewisse Bedeutung zu besitzen, weil er es ermöglicht, einen Aufschluß über das Schicksal des Chlorcalciums im Milchserum zu geben und weil er einen gewissen Einblick in die Vorgänge, die sich bei der Gewinnung des Chlorcalciumserums abspielen, gestattet.

Über das Schicksal des Chlorcalciums bei der Darstellung des Serums nach Ackermann.

Zu dieser Frage äußert sich Ackermann in seiner ersten Veröffentlichung über das Chlorcalciumserum folgendermaßen¹⁾:

„Der Zusatz von Chlorcalcium ist so bemessen, daß sein Einfluß auf die Refraktion unbedeutend ist. Der Vorgang der Reaktion selbst in quantitativer Beziehung ist uns unbekannt, da wir nicht bestimmt haben, wieviel von dem zugesetzten Chlorcalcium in Lösung bleibt. Es hat dies auch keine Bedeutung, da es sich ja nur um vergleichbare Zahlen und nicht um absolute Werte handelt.“

Eine von dieser etwas abweichende Meinung äußern zur selben Frage Pfyl und Turnau in ihrer umfangreichen und verdienstvollen Arbeit „Über verbesserte Herstellung von Milchseren und ihre Anwendbarkeit zur Untersuchung der Milch“. Sie sagen darüber folgendes²⁾:

„Aus der Tabelle 8 geht weiter hervor, daß die Lichtbrechung von Chlorcalciumserum um 1,0—1,6⁰ geringer ist, als die des Tetraserums II. Würde keine chemische Einwirkung durch den Zusatz von Chlorcalcium stattfinden, so sollten die beiden Lichtbrechungen über-

¹⁾ Diese Zeitschrift 1907, 13, 188.

²⁾ Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1912, 40, 261.

einstimmen, da durch besondere Versuche festgestellt wurde, daß der Einfluß der Zusätze an sich in beiden Fällen die gleiche Erhöhung der Lichtbrechung um etwa 0,4—0,5 Refraktometergrade bewirkt. Die geringere Brechung der Chlorcalciumseren muß also auf die Entfernung von Lösungsbestandteilen und zwar im wesentlichen auf die oben schon nachgewiesene Ausfällung von Calciumsalzen zurückgeführt werden. Dies konnte durch den Versuch bestätigt werden. In einer etwa 7%-igen Milchzuckerlösung, die mit der für das Serum vorgeschriebenen Menge Essigsäure versetzt war, wurde soviel Calciumcarbonat und Phosphorsäure aufgelöst, wie bei der Herstellung der Chlorcalciumseren ausfällt. Die erforderlichen Mengen wurden nach den Ergebnissen der Tabelle 6 S. 256/257 für einige Milchsorten mit bekannten Refraktometerwerten der beiden Seren berechnet. Diese Zusätze bewirken eine Erhöhung der Lichtbrechung der Milchzuckerlösung um a) 1,3, b) 1,2, c) 1,0 Refraktometergrade, während die Differenzen zwischen den Lichtbrechungen vom Tetraserum II und Chlorcalciumserum a) 1,4, b) 1,1, c) 1,0 betragen. Die Differenz der Lichtbrechung beider Seren ist also im wesentlichen durch die Ausfällung von Kalksalzen und Phosphaten bedingt. Citrate und Magnesiumsalze sind hierbei nicht berücksichtigt worden, obwohl sie vielleicht bei größeren Differenzen in Frage kommen können.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann die Annahme von Ackermann, daß durch den Zusatz von 0,25 ccm 15%-iger Chlorcalciumlösung zu 30 ccm Milch die Lichtbrechung des Milchserums unbedeutend geändert werde, nicht bestätigt werden.“

Nach Ackermann übt also der Zusatz des Chlorcalciums in einer Menge von 0,25 ccm einer etwa 15%-igen Lösung auf die Refraktion nur einen unbedeutenden Einfluß aus. Man hat sich denselben etwa folgendermaßen vorzustellen: Durch den Zusatz von 0,25 ccm Chlorcalciumlösung zu 30 ccm Milch findet eine Verdünnung um $\frac{1}{120}$ oder um 0,83% statt. Da die Differenz zwischen der Refraktion des Chlorcalciumserums und derjenigen des destillierten Wassers in Skalenteilen des Zeiß'schen Eintauchrefraktometers etwa $39 - 15 = 24$ Skalenteile beträgt, so dürfte die Beeinflussung der Refraktion durch den Zusatz von 0,25 ccm der Chlorcalciumlösung etwa 0,2 Skalenteile ausmachen, welchem Wert wirklich nur wenig Bedeutung beigemessen werden kann. Nach dieser Auffassung liegt die Refraktionszahl des Chlorcalciumserums nur um etwa 0,2 Skalenteile tiefer als diejenige eines idealen Milchserums, das sich ohne jeden Zusatz erhalten ließe. Zur Verminderung der Refraktion durch die Verdünnung gesellt sich eine Erhöhung derselben durch das zugesetzte Chlorcalcium. Wie hoch die Wirkung dieses Zusatzes ist, darüber vermag uns Ackermann keine Angaben zu machen, da er nicht bestimmt hat, wieviel vom zugesetzten Chlorcalcium in Lösung bleibt.

Anders denken in dieser Beziehung Pfyl und Turnau. Nach ihren Versuchen soll durch den Zusatz von 0,25 ccm der Chlorcalciumlösung zu 30 ccm Milch eine Verminderung der Refraktionszahl des Serums um etwa 1,2 Skalenteile des Eintauchrefraktometers bewirkt werden. Da die Differenzen zwischen den Lichtbrechungen des Tetraserums und des Chlorcalciumserums dem Wert von 1,2 Skalenteilen entsprechen, so ergäbe sich daraus die Schlußfolgerung, daß eben das Tetraserum II einem solchen idealen Milchserum am nächsten kommt. Würde dies für das Tetraserum II tatsächlich zutreffen, so müßte es, auch wenn seine Darstellung gegenüber dem Chlorcalciumserum umständlicher ist, bevorzugt werden und zwar aus dem Grunde, weil es durch die Zusätze am wenigsten verändert wird und somit den Wert größerer Wissenschaftlichkeit besitzt. Da die Kryoskopie der Milch und des Chlorcalciumserums es uns einigermaßen ermöglicht, in die Vorgänge, die sich bei der Darstellung des Chlorcalciumserums abspielen, einen Einblick zu gewinnen, wurde auch versucht,

die Frage zu prüfen, inwiefern das Chlorcalciumserum sich von einem idealen, ohne Zusätze gewonnenen Serum unterscheidet.

Schon weiter oben wurde gezeigt, daß 0,25 ccm der 15⁰/₀-igen Chlorcalciumlösung, zu 30 ccm destilliertem Wasser gegeben, eine Erhöhung der Refraktion um 0,75 Skalenteile und eine Gefrierpunktserniedrigung von 0,075⁰ bewirken. Werden zu 30 ccm Milch 0,25 ccm Chlorcalciumlösung von 15⁰/₀ hinzugegeben, so zeigt diese Milch statt des ursprünglichen Gefrierpunktes von — 0,55⁰ einen solchen von — 0,625⁰. Nun wird zur Darstellung des Serums nach Ackermann das Ganze 15 Minuten lang im kochenden Wasserbade erhitzt. Das Casein, die löslichen Eiweißstoffe, das Fett werden gefällt und wir erhalten eine klare Flüssigkeit, das Serum, das sämtliche löslichen Bestandteile der Milch, die den Gefrierpunkt beeinflussen, in Lösung enthält. Würde bei der Herstellung des Serums das zugesetzte Chlorcalcium nur die Rolle eines Katalysators spielen, so müßte diese Chlorcalciummenge vollständig im Serum sich wiederfinden, und das Serum müßte einen um — 0,075⁰ höheren Gefrierpunkt zeigen als die ursprüngliche Milch. Dies ist nicht der Fall. Da durch den Zusatz von Chlorcalcium eine Steigerung der Konzentration der Calciumionen in der Milch stattfindet und da letztere unter anderem auch lösliche Phosphate enthält, so ist die Ausfällung von unlöslichem Calciumphosphat zu erwarten. Nach den Untersuchungen von Pfyl und Turnau könnte man versucht sein, anzunehmen, daß beinahe die gesamte bei der Darstellung des Serums nach Ackermann zugesetzte Menge Calcium in Form von Calciumsalzen ausgefällt wird. Würde diese Annahme tatsächlich zutreffen, so müßten Milch und Chlorcalciumserum ungefähr die gleiche Gefrierpunktserniedrigung aufweisen. Dies ist aber keineswegs der Fall. Nach unseren Versuchen weist das Chlorcalciumserum eine Gefrierpunktserniedrigung auf, die im Mittel um 0,05⁰ höher ist als diejenige der ursprünglichen Milch. Es ergibt sich somit aus unseren Versuchen die Schlußfolgerung, daß bei der Darstellung des Chlorcalciumserums nach Ackermann etwa ein Drittel des zugesetzten Calciums in Form von unlöslichen Kalksalzen, wie z. B. Phosphaten ausgefällt wird, während die anderen zwei Drittel im Serum zurückbleiben dürften.

Die im Serum zurückgebliebene Menge des zugesetzten Chlorcalciums bedingt eine um etwa 0,5 Skalenteile höhere Refraktionszahl, als sie die Milchbestandteile allein aufgewiesen hätten. Zieht man in Betracht, daß die ausgefallenen Milchbestandteile eine Verminderung der Brechung des Chlorcalciumserums um vielleicht 0,2—0,3 Skalenteile hervorrufen, und berücksichtigt man ferner die durch den Zusatz von Chlorcalciumlösung bedingte, allerdings geringe Verdünnung, so ergibt sich, daß die Refraktion des Serums durch diese Zusätze nur sehr wenig verändert wird. Ackermann hatte also Recht, als er behauptete, daß durch den Zusatz des Chlorcalciums nach seiner Vorschrift die Lichtbrechung des Milchserums nur unbedeutend verändert wird. Diese Behauptung ist von ihm aber nicht auf Grund ausführlicher Untersuchungen aufgestellt worden, denn der Vorgang der Reaktion blieb ihm, wie er selbst sagt, in quantitativer Beziehung unbekannt. Vielmehr ist hier das Richtige durch jenes Feingefühl, das hervorragenden Analytikern eigen ist, erkannt und erfaßt worden.

Wenn auch das Chlorcalciumserum vermöge seiner raschen und handlichen Herstellungsweise eine ausgedehnte praktische Anwendung und allseitige Anerkennung fand, so ist die wissenschaftliche Begründung und Erforschung der Vorgänge, die sich bei der Bildung des Serums abspielen, nur wenig gefördert worden. Auch Wiegner

hat in seinen wissenschaftlichen Arbeiten über das Chlorcalciumserum diese Frage nicht näher untersucht. Erst Pfyl und Turnau haben gelegentlich ihrer Untersuchungen über die Zusammensetzung der von diesen Forschern empfohlenen Tetrasera auch über das Chlorcalciumserum, besonders über seinen Calciumgehalt, sehr interessante Mitteilungen gemacht. Allerdings können wir uns nicht den Schlußfolgerungen der genannten Forscher in allem anschließen, besonders nicht, was die angebliche starke Beeinflussung des Serums durch das zugesetzte Chlorcalcium betrifft. Das ausführliche von Pfyl und Turnau zusammengetragene Analysenmaterial scheint gerade im Gegenteil die unsererseits gemachte Annahme, daß nur etwa ein Drittel des zugesetzten Calciums in Form von Kalksalzen ausgeschieden wird, zu bestätigen. Wir müssen deshalb auf diese Untersuchungsergebnisse etwas näher eingehen.

Pfyl und Turnau¹⁾ haben 53,35 ccm Milch, entsprechend 50,0 ccm Tetraserum mit 1 ccm 20%-iger Essigsäure und 5 ccm Tetrachlorkohlenstoff geschüttelt und zentrifugiert. 25,5 ccm des abdestillierten Serums ergaben 0,035 g Calciumoxyd. Der Rest des Serums zusammen mit dem Caseinkuchen enthielt dieselbe Calciummenge, entsprechend 0,036 g Calciumoxyd. Die Gesamtmenge Calciumoxyd betrug in 53,35 ccm Milch 0,071 g. Ganz anders hingegen verhielt sich das Chlorcalciumserum. Die genannten Forscher haben 60,0 ccm Milch, entsprechend 57,2 ccm Serum nach Ackermann, mit der entsprechenden Menge Chlorcalciumlösung versetzt und im Wasserbade erhitzt. 28,6 ccm des abgegossenen Serums enthielten 0,026 g Calciumoxyd, die andere Hälfte mit dem Niederschlag zusammen ergab dagegen bedeutend mehr Kalk, nämlich 0,187 g Calciumoxyd²⁾. Ferner geben Pfyl und Turnau eine weitere Reihe von Versuchen an, bei denen in den verschiedenen Seren aus den gleichen Milchsorten der Gehalt an Calcium (Ca) und an Phosphatrest (PO_4) bestimmt und unter Berücksichtigung der Verdünnung der Seren durch die Zusätze, — beim Chlorcalciumserum unter Berücksichtigung des zugefügten Chlorcalciums — auf den Gehalt von Calcium und Phosphatrest der unveränderten Milch umgerechnet wurde. Die so berechneten in eine Tabelle aufgenommenen Werte für das Tetraserum II und das Chlorcalciumserum seien hier wiedergebracht. An Hand dieser Tabelle soll auch versucht werden, eine Deutung der bei der Herstellung des Chlorcalciumserums sich abspielenden Vorgänge zu geben. Der Übersicht halber sind hier beim Tetraserum II die auf unverdünntes Serum umgerechneten Mengen wiedergegeben.

¹⁾ Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1912, 40, 248.

²⁾ Da dieser Befund von Pfyl und Turnau bereits in der Literatur angeführt wurde (Diese Zeitschrift 1913, 26, 179), so seien uns einige kritische Bemerkungen gestattet: Die 60,0 ccm Milch enthielten nach dem Zusatz von Chlorcalcium $0,026 + 0,187 = 0,213$ g Calciumoxyd. Zieht man von dieser Menge Calciumoxyd das der Menge von 0,5 ccm einer 15%-igen Chlorcalciumlösung entsprechende Gewicht von 0,038 g Calciumoxyd ab, so ergibt sich, daß die zur Herstellung des Chlorcalciumserums verwendeten 60,0 ccm Milch 0,175 g Calciumoxyd enthielten. Dagegen enthielten 60,0 ccm der für das Tetraserum verwendeten Milch nur $x = 0,080$ g Calciumoxyd ($53,35 : 0,071 = 60 : x$). Hieraus folgt, daß die zur Herstellung des Chlorcalciumserums verwendete Milch mehr als die doppelte Menge Calciumoxyd enthielt, als die zur Herstellung des Tetraserums verwendete. Dies ist kaum wahrscheinlich. Sollte hier nicht ein Druckfehler vorliegen, so müßte angenommen werden, daß zur Herstellung des Chlorcalciumserums eine ganz abnorme Milch verwendet worden ist.

Calcium- und Phosphatgehalt der verschiedenen Milchseren.
100 cem Serum enthalten:

Nr.	Tetraserum II		Chlorcalciumserum			
	Calcium (Ca), umgerechnet auf un- verdünntes Serum	Phosphatrest (PO ₄), umgerechnet auf un- verdünntes Serum	Calcium (Ca)		Phosphatrest (PO ₄)	
	g	g	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum ohne Zusatz g	gefunden	umgerechnet auf unverdün- ntes Serum g
1	0,099	0,216	0,062	0,009	0,087	0,088
2	0,116	0,209	0,068	0,015	0,087	0,088
3	0,118	0,240	0,064	0,011	0,096	0,097
4	0,117	0,231	0,063	0,010	0,100	0,101
5	0,117	0,245	—	—	—	—
6	0,129	0,229	0,067	0,014	0,104	0,105
7	0,123	0,222	0,072	0,019	0,117	0,118
8	0,107	0,235	0,069	0,016	0,094	0,095
9	0,125	0,246	0,057	0,004	0,120	0,121
10	0,107	0,225	0,062	0,009	0,112	0,113
11	0,105	0,236	0,062	0,009	0,107	0,108
12	0,112	0,218	0,063	0,010	0,104	0,105
13	0,111	0,225	0,060	0,007	0,109	0,110
14	0,106	0,220	0,062	0,009	0,109	0,110

Ein Vergleich beider Seren an Hand dieser Tabelle zeigt uns, daß das Tetraserum einen viel höheren Gehalt an Calcium, sowie an Phosphatrest aufweist als das Chlorcalciumserum. Der geringere Gehalt des Chlorcalciumserums an Calcium und Phosphatrest ist einerseits darauf zurückzuführen, daß das Tetraserum II, zu dessen Herstellung Essigsäure Verwendung findet, neben anderen Salzen auch den Caseinkalk in Lösung bewahrt, andererseits aber, was den Phosphatrest betrifft, darauf, daß bei der Herstellung des Chlorcalciumserums eine Ausfällung von Phosphorsäure wohl in Form von Calciumsalzen stattfindet.

Im Tetraserum II stehen die Gehalte von Calcium und Phosphatrest im Verhältnis von 1 : 2, im Chlorcalciumserum dagegen verhalten sich beide Werte wie 2 : 3, oder wie 1 : 1,5. Mit anderen Worten, das Chlorcalciumserum enthält verhältnismäßig viel mehr Calcium als das Tetraserum. Dieser Mehrgehalt an Calcium kann nur vom zugesetzten Chlorcalcium herrühren, indem nur ein Teil des letzteren mit den Phosphaten der Milch ausfällt, der Rest aber im Serum in Lösung enthalten ist. Die Frage ist nun die, wieviel vom zugesetzten Chlorcalcium in Lösung bleibt, bzw. wieviel in Form von Phosphaten ausgefällt wird. Nach den Ergebnissen der kryoskopischen Untersuchungen glauben wir annehmen zu dürfen, daß etwa ein Drittel des zugefügten Chlorcalciums gefällt wird und zwei Drittel im Serum verbleiben. Das Analysenmaterial obiger Tabelle scheint mir diese Annahme zu bestätigen und zwar auf Grund folgender Überlegungen:

Im Tetraserum liegt, wie Pfyl und Turnau gezeigt haben, die gesamte in der Milch vorhandene Calciummenge, also auch die an Casein gebundene, in Lösung vor. Nach Söldner¹⁾ beträgt die an Casein gebundene Menge Calciumoxyd 5,13 % der

¹⁾ Landw. Versuchsstationen 1888, 35, 351.

Milchasche. Da der Aschengehalt der Milch im Mittel 0,7 % beträgt, so ergibt sich daraus, daß 100 g Milch etwa 0,036 g an Casein gebundenes Calciumoxyd enthalten. Wir haben diese Werte auf 100 g unverdünntes Tetraserum II umgerechnet und dabei gefunden, daß ungefähr ein Drittel des im Tetraserum vorhandenen Calciums als von Caseinkalk herrührend zu betrachten ist. Zieht man im Tetraserum die auf den Caseinkalk entfallende Menge Calcium ab, so ergibt sich dann zwischen Calcium und Phosphatrest ein Verhältnis von 1:3, d. h. in der Milch kommen, abgesehen vom Caseinkalk, auf 3 Teile Phosphatrest 1 Teil Calcium. Da im Chlorcalciumserum der Caseinkalk fehlt und ferner durch Zusatz von Calciumionen Phosphatrest ausgefällt wird, so darf für den in diesem Serum zurückgebliebenen Phosphatrest dasselbe Verhältnis zu Calcium angenommen werden, wie es oben für die Milch abgeleitet worden ist. Daraus ergibt sich, daß auf die Menge a des im Chlorcalciumserum vorhandenen Phosphatrestes $\frac{1}{3}a$ an Calcium, das aus der Milch stammt, anzunehmen ist. Wird von der im Chlorcalciumserum gefundenen Menge Calcium $\frac{1}{3}a$ abgezogen, so erhält man die vom zugesetzten Chlorcalcium im Serum zurückgebliebene Menge Calcium. Kennt man diesen Wert, so ergibt sich durch Subtraktion vom zugesetzten Chlorcalcium die Menge des in Form von Phosphaten bei der Herstellung des Serums ausgefallenen Calciums. In der folgenden Tabelle sind diese Werte zusammengestellt.

Milch Nr.	Phosphatrest (PO_4) gefunden g	gefunden	Calcium (Ca)		vom zugesetzten Calcium sind ausgefallen g
			aus der Milch stam- mend $\text{Ca} = \frac{1}{3}$ Phos- phatrest (PO_4) g	aus dem zuge- setzten Chlorcal- cium stammend g	
1	0,087	0,062	0,029	0,033	0,021
2	0,087	0,068	0,029	0,039	0,015
3	0,096	0,064	0,032	0,032	0,022
4	0,100	0,063	0,033	0,030	0,024
5	—	—	—	—	—
6	0,104	0,067	0,035	0,032	0,022
7	0,117	0,072	0,039	0,033	0,021
8	0,094	0,069	0,032	0,037	0,017
9	0,120	0,057	0,040	0,017	0,037
10	0,112	0,062	0,037	0,025	0,029
11	0,107	0,062	0,036	0,026	0,028
12	0,104	0,063	0,035	0,028	0,026
13	0,109	0,060	0,036	0,024	0,030
14	0,109	0,062	0,036	0,026	0,028

Nach dem oben Gesagten darf auf Grund der Ergebnisse der kryoskopischen Untersuchung der Milch und des Chlorcalciumserums angenommen werden, daß mindestens ein Drittel des zugesetzten Chlorcalciums ausgefällt wird. Für 100 ccm Chlorcalciumserum beträgt dieser Zusatz 0,054 g Calcium. Ein Drittel davon macht 0,018 g aus. Nach obiger Betrachtungsweise der Analysenergebnisse von Pfyl und Turnau stellt sich die Menge des ausgefallenen Calciums im Mindestfalle auf 0,015 (Milch Nr. 2) und im Höchstfalle auf 0,037 (Milch Nr. 8), im Mittel also auf 0,026 g,

was einen Wert darstellt, der ziemlich gut mit dem aus der Kryoskopie abgeleiteten übereinstimmt.

Selbstverständlich können diese Werte nur annähernd richtig sein. Es sind bei unserer Betrachtungsweise alle etwa sich abspielenden Nebenreaktionen außer acht gelassen worden. Wir haben nur versucht, anzudeuten, welche Vorgänge bei der Herstellung des Chlorcalciumserums in Betracht kommen können. Eine restlose Klärung dieser Frage wird aber erst dann möglich werden, wenn einmal der Bindungszustand der in der Milch und im Chlorcalciumserum vorhandenen Basen und Säuren nach den Lehren der physikalischen Chemie aufgeklärt sein wird, etwa so, wie es von der Heide und Baragiola¹⁾ mit ihren Mitarbeitern durch Aufstellung von Bilanzen der Weinbestandteile durchgeführt haben. Zur Klärung dieser Frage wird die Kryoskopie aber immerhin wichtige Beiträge zu liefern vermögen.

Veränderung der Lichtbrechung des Chlorcalciumserums mit dem Altern der Milch und mit der Länge der Kühldauer des fertigen Serums.

Schon Mai und Rothenfußer²⁾ haben darauf hingewiesen, daß man aus saurer Milch ein trübes Serum erhält, das eine stärkere Lichtbrechung zeigt als aus frischer Milch hergestelltes Serum. Die genannten Forscher nehmen an, daß die stärkere Lichtbrechung auf die aus der Lactose sich bildende Milchsäure zurückzuführen ist. Pfyl und Turnau³⁾ haben ebenfalls gezeigt, daß die Lichtbrechung des Chlorcalciumserums bei freiwilliger Säuerung zunimmt. Im Gegensatz zu Mai und Rothenfußer erklären sie diese Erscheinung damit, daß die entstandene Milchsäure die durch die Einwirkung des Chlorcalciumserums abgeschiedenen Calciumsalze wieder auflöst. Durch besondere Versuche, bei denen das Calcium im Chlorcalciumserum frischer und gesäuerter Milch bestimmt wurde, konnte diese Schlußfolgerung als richtig bestätigt werden.

Schütz und Wein⁴⁾ haben zuerst auf eine weitere Eigenschaft des Chlorcalciumserums hingewiesen, nämlich darauf, daß die Lichtbrechung desselben mit der Länge der Kühldauer des fertigen Serums steigt. Wenn man von einer und derselben Milchprobe eine größere Anzahl von Chlorcalciumseren herstellt, so macht man die Beobachtung, daß die Lichtbrechung des Serums um so höher steigt, je länger es im Kühlbade gestanden hat, d. h. je später man zur Bestimmung des Refraktionswertes schreitet. Zur Erklärung der Ursache dieser Zunahme der Lichtbrechung waren zwei Möglichkeiten gegeben: Entweder tritt eine allmähliche Wasserverdunstung durch das Kühlrohr ein, oder es gehen ausgeschiedene Teile des Serums nach und nach wieder in Lösung. Daß die Erhöhung der Refraktometerzahl ihren Grund nicht in einer Wasserverdunstung haben kann, ist durch besondere Versuche bewiesen worden. Die selbsttätige Erhöhung der Lichtbrechung wird vielmehr dadurch verursacht, daß das Serum mit dem Coagulum in Berührung bleibt, denn die Seren ohne Coagulum zeigen diese Erhöhung nicht. Schütz und Wein schließen sich der Annahme von Pfyl und Turnau an, nach welcher es sich hierbei um eine langsame und folge-

¹⁾ Siehe z. B.: W. I. Baragiola und Ch. Godet in Zeitschr. analyt. Chem. 1914, 53, 100—114.

²⁾ Diese Zeitschrift 1908, 16, 14.

³⁾ Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1912, 40, 268.

⁴⁾ Diese Zeitschrift 1913, 26, 180.

weise Wiederauflösung der ausgeschiedenen Kalksalze auch ohne Mitwirkung von Milchsäure handelt. Diese Beobachtung der genannten Forscher konnte von uns vollauf bestätigt werden. Noch vor dem Erscheinen ihrer Arbeit haben wir die gleiche Beobachtung ebenfalls gemacht. Bei der Untersuchung von großen Reihen von Milchproben ist es hie und da vorgekommen, daß die fertigen Seren über Nacht stehen blieben. Bei solchen Seren wurden im allgemeinen etwas höhere Refraktionszahlen beobachtet als sonst. Zur Aufklärung dieser Erscheinung wurden auch unsererseits Versuche angestellt, über die weiter unten berichtet wird. Wir konnten dabei die von Pfyl und Turnau gemachte Annahme, daß es sich bei der beschriebenen Erscheinung um eine Wiederauflösung von ausgeschiedenen Salzen handelt, auf kryoskopischem Wege bestätigen.

In neuerer Zeit hat diese Eigenschaft des Chlorcalciumserums, mit der Länge der Kühldauer seine Refraktionszahl zu ändern, ein vermehrtes Interesse gewonnen. A. Gabathuler¹⁾ hat in einer verdienstvollen Arbeit über die Bedeutung des Milchezuckers für die hygienische Beurteilung der Milch den Milchezuckergehalt in einer Anzahl von Proben nach dem refraktometrischen Verfahren von Wollny bestimmt und zugleich die Refraktionszahl des Chlorcalciumserums nach Ackermann mit dem Eintauchrefraktometer ermittelt. Auf einen Punkt macht der Verfasser besonders aufmerksam, indem er schreibt:

„In den meisten Abhandlungen über die Methode der Wollny'schen Milchezuckerbestimmung wird angegeben, daß das Ablesen sofort nach dem Kochen und Abkühlen erfolgen soll. Ich habe das anfänglich auch getreulich befolgt und dabei Werte erhalten, die nicht richtig sein konnten. In der Folge habe ich dann mit dem Ablesen gewartet und dabei nicht nur bedeutend mehr Serum bekommen, sondern auch mehr Milchezucker gefunden. Durch Versuche habe ich dann festgestellt, daß die Konzentration des Serums nach 24 Stunden beendet ist; ein vorheriges Ablesen ist nicht tunlich, da nach meinen Versuchen auch 4 Stunden nach dem Kochen das Serum noch nicht konstante Werte gibt.

Gabathuler machte, offenbar ohne die Arbeiten von Pfyl und Turnau, von Schütz und Wein zu kennen, die Beobachtung, daß, wenn er einerseits die Refraktionszahl sofort nach dem Kühlen und andererseits 24 Stunden später bestimmte, diese in letzterem Falle zugenommen hatte. Da diese letztere Zahl nach der Tabelle von Wollny ihm den richtigen Gehalt an Milchezucker angibt, zieht er daraus den Schluß, daß im Serum eine allmähliche Konzentration stattfindet, die nach 24 Stunden beendet ist.

In einer Arbeit „Neue Beiträge zur Untersuchung der Milch“²⁾ beweist Ackermann, daß die Annahme von Gabathuler, es finde eine Konzentration des Serums statt, unrichtig ist. Ackermann sagt darüber folgendes: „Im vorliegenden Falle handelt es sich um eine wässrige Milchezuckerlösung, und eine Konzentration derselben, wie sie der Verfasser annimmt, kann nur stattfinden:

- a) durch Verdampfen von Wasser,
- b) durch Neubildung von Milchezucker.

Bei der Serumbereitung nach Wollny wird der Wasserverlust behindert, indem das Kochen und Abkühlen in hermetisch verschlossenen Fläschchen vorgenommen wird. Findet ein Wasserverlust statt, so ist die Bestimmung sowieso falsch, bei

¹⁾ Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene 1914, 24, 97.

²⁾ Mitteil. d. Schweizer. Gesundheitsamtes 1916, 7, 319.

richtigem Arbeiten ist somit eine Konzentration durch Wasserverlust ausgeschlossen. Nun bleibt der zweite Fall: Konzentration durch Neubildung von Milchzucker; als Chemiker müssen wir sagen, daß dies unmöglich ist“.

Der Annahme von Pfyl und Turnau, es handle sich um eine langsame und folgeweise Wiederauflösung der ausgeschiedenen Kalksalze, kann Ackermann nicht unbedingt beipflichten. Denn versetzt man eine Probe des Serums, die unmittelbar nach dem Kühlen vom Coagulum abgegossen wurde, sofort oder nach 24-stündigem Stehen mit Salpetersäure und kocht, so tritt im ersten Falle nur eine milchige Trübung ein, während hingegen das Serum, das mit dem Coagulum längere Zeit in Berührung geblieben war, eine starke, weiße, flockige Fällung ergibt; es handelt sich um Albumin, das in Lösung gegangen ist. Dieser Annahme von Ackermann können wir uns nicht anschließen. Auf Grund der von uns ausgeführten Versuche ergibt sich eher die Richtigkeit der von Pfyl und Turnau gemachten Annahme. Von einer und derselben Milchprobe wurde eine größere Anzahl von Chlorcalciumseren nach Ackermann hergestellt. Bei einigen dieser Seren wurden Lichtbrechung und Gefrierpunkt kurz nach dem Kühlen bestimmt. Die anderen Seren wurden 17 bis 27 Stunden im Kühlbade gelassen und erst nach diesem Zeitpunkt Refraktionszahl und Gefrierpunkt ermittelt. Nachfolgende Zusammenstellung zeigt die Ergebnisse einer Reihe von derartigen Untersuchungen:

Serum-		Milchprobe		
		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3
Refraktion	{ sofort nach dem Kühlen	39,1	39,4	39,0
	{ nach 17—24 Stunden	40,0	39,9	39,5
Gefrierpunkt	{ sofort nach dem Kühlen	—0,590°	—0,585°	—0,59°
	{ nach 17 Stunden	—0,598°	—0,595°	—0,60°

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß Hand in Hand mit einer Zunahme der Refraktionszahl des Chlorcalciumserums eine Zunahme des Gefrierpunktes stattfindet. Wie eingangs dieser Arbeit gezeigt worden ist, beeinflussen die Eiweißstoffe den Gefrierpunkt nicht; die Veränderung des Gefrierpunktes kann also nur durch eine Wiederauflösung der ausgeschiedenen Salze erklärt werden. Auffallend ist diese Erscheinung nicht, da Citronensäure die Eigenschaft besitzt, unlösliche Calciumphosphate teilweise aufzulösen; man denke an die „citratlösliche Phosphorsäure“ der Agrikulturchemiker. Citronensäure ist aber in der Milch und auch im Serum vorhanden. Aus den Versuchen von Ackermann ergibt sich immerhin, daß neben den Salzen auch etwas Eiweiß in Lösung geht.

Weitere Vergleiche zwischen Lichtbrechung und Kryoskopie.

Nach Wiegner beträgt der mittlere Gehalt des Chlorcalciumserums an Milchzucker 5,2%. Eine genau eingestellte 5,2%-ige Milchzuckerlösung weist nach unseren Versuchen bei 17,5° eine Refraktionszahl von 34,0 Skalenteilen des Zeiß'schen Eintauchrefraktometers auf. Nehmen wir nun an, daß das Chlorcalciumserum im Mittel eine Refraktion von 39,0 Skalenteilen zeigt, so ergibt sich daraus, daß die Mineralstoffe im Chlorcalciumserum die Refraktion um 5 Skalenteile des Eintauchrefraktometers beeinflussen. Wasser von 17,5° hat eine Refraktion von 15,0 Skalenteilen des Eintauchrefraktometers. Die 5,2 g Milchzucker zu 100 ccm in Wasser gelöst bewirken eine Erhöhung der Refraktion um 19,0 Skalenteile. Die Licht-

brechung der Milchzuckermenge, die im Chlorcalciumserum enthalten ist, ist beinahe viermal größer als diejenige der Mineralstoffe, d. h. die Refraktion des Serums ist hauptsächlich durch den Milchzuckergehalt und nur zum geringen Teil durch den Mineralstoffgehalt bedingt. Anders liegen die Verhältnisse bei der Kryoskopie. Die bereits oben erwähnte 5,2 0/0-ige Milchzuckerlösung weist einen Gefrierpunkt von $-0,29^{\circ}$, Chlorcalciumserum im Mittel einen solchen von $-0,58^{\circ}$ auf. Die Gefrierpunktserniedrigung, die durch die Anwesenheit der Mineralstoffe hervorgerufen wird, ist ebenso groß wie die durch den Milchzuckergehalt bedingte. Zieht man in Betracht, daß das Verhältnis der Mineralstoffe zum Milchzuckergehalt in der Milch etwa 1:7 beträgt, so folgt daraus, daß hinsichtlich des Gefrierpunktes größere Schwankungen im Milchzuckergehalt durch kleinere Schwankungen im Mineralstoffgehalt ausgeglichen werden können. Damit erklärt sich, warum eine Milch, die eine ungewöhnlich niedrige Refraktionszahl des Serums aufweist, also im Milchzuckergehalt stark zurückgegangen ist und dazu salzig schmeckt, einen normalen Gefrierpunkt von $-0,54$ bis $0,55^{\circ}$ zeigt. In vielen Fällen haben wir feststellen können, daß bei solchen Milchproben der Gehalt an Mineralstoffen normal, der Chlorgehalt der Asche dagegen auffallend hoch war. Die Erklärung hierfür erscheint ganz einfach.

Die Gefrierpunktserniedrigung ist nicht nur von der Menge der gelösten Stoffe, sondern auch von deren Molekulargewicht und vom Dissoziationsgrad abhängig. Der Milchzucker hat ein hohes Molekulargewicht (360) und ist in wässriger Lösung undissoziiert; die Milchsätze dagegen, Natrium- und Kaliumchlorid, Phosphate, besitzen ein verhältnismäßig niedriges Molekulargewicht und sind in verdünnter wässriger Lösung mehr oder weniger dissoziiert. Bei normaler Funktion der Milchdrüsen ist der Gehalt an Milchzucker und Salzen nur geringen Schwankungen unterworfen, der osmotische Druck des ausgeschiedenen Sekrets ist nahezu konstant. In den Fällen, wo die Drüse in ihren Funktionen krankhaft zu arbeiten beginnt, findet, wie zahlreiche Forschungen gezeigt haben, zuerst ein starker Rückgang des Milchzuckergehaltes statt, der osmotische Druck, die Gefrierpunktserniedrigung bleiben aber noch immer normal. Die kranke Drüse arbeitet nicht mit der Vollkommenheit einer gesunden, das osmotische Gleichgewicht scheint aber in einfacher Weise ausgeglichen zu werden. Der starke Milchzuckergehalt wird bei gleichbleibendem Mineralstoffgehalt dadurch wett gemacht, daß einzelne Salze in vermehrter, andere in verminderter Menge ausgeschieden werden. In solchen Fällen nimmt der Natrium- und Chlorgehalt stark zu, der Kali-, Kalk- und Phosphorsäuregehalt stark ab. Trotz gleichbleibender Salzmenge haben wir eine größere Anzahl Molekeln und Ionen, wodurch das osmotische Gleichgewicht in verhältnismäßig einfacher Weise wieder hergestellt wird. Es trifft nicht zu, wie etwa angenommen wird, daß die in ihrer Funktion gestörten Drüsenzellen die Auswahl der notwendigen Salze nicht mehr so sorgfältig treffen. Im Gegenteil; die einfachste Art der Herstellung des osmotischen Gleichgewichtes bei Rückgang des Milchzuckergehaltes unter Beibehaltung des Gesamtgewichtes der Mineralstoffe ist der Ersatz hochmolekularer Verbindungen durch solche von geringerem Molekulargewicht. Diesen einfachen Weg scheint die Zelle bei anfänglichen funktionellen Störungen zuerst einzuschlagen. Nach der gewöhnlichen chemischen Untersuchung und nach der Refraktionszahl des Serums (siehe die Zusammenstellung auf S. 93) werden solche Milchproben als gewässert beurteilt oder mindestens als verdächtig erklärt. Durch eine Bestimmung des Gefrierpunktes kann man sich mit Leichtigkeit davon überzeugen, daß man es zwar mit einer hinsichtlich Zusammen-

setzung abnormen, aber durchaus unverfälschten Milch zu tun hat. In solchen Fällen leistet die Kryoskopie vortreffliche Dienste, indem sie eine ungerechte Verdächtigung ausschließt. Einige solche Fälle werden weiter unten noch näher besprochen.

Anwendung der Ergebnisse auf praktische Fälle.

Trotz aller Fortschritte auf dem Gebiete der Milchanalyse kann mitunter die Beurteilung einer Milch, selbst wenn eine Vergleichsprobe vorliegt, dem Analytiker viel Kopfzerbrechen verursachen und erst nach langwierigen Untersuchungen kann unter Umständen ein bestimmtes Urteil abgegeben werden. In einer äußerst interessanten Arbeit: „Beiträge zur Beurteilung der Milch“ hat Amberger¹⁾ an der Hand einiger Beispiele zeigen können, wie bei der Beurteilung einer Milch nicht nur die Milchanalyse, sondern auch die Refraktion des Chlorcalciumserums und die Nitratreaktion versagt haben. Allerdings ist dann das Auftreten der Nitratreaktion in einer Stallmilchprobe später aufgeklärt worden. Milchproben mit 5,67 und 6,46 % fettfreier Trockensubstanz, mit Refraktionszahlen von 29,6 bzw. 30,3 und mit positiver Nitratreaktion scheinen im allgemeinen durch Wasserezusatz verfälscht zu sein. Dies war die Beschaffenheit der Vergleichsproben. Nun wäre an der Sache nichts Auffallendes, denn wir wissen aus der Literatur, daß Milch von euterkranken Kühen eine abnorme Zusammensetzung aufweist und daß der Gehalt an fettfreier Trockensubstanz und an Milchzucker in solchen Fällen erheblich herabgesetzt sein kann. Es dürfte sich im vorliegenden Falle um Milch von einer kranken Kuh handeln. Nun gab aber der Bezirkstierarzt folgendes Gutachten ab:

Er habe die fragliche Kuh untersucht und bei derselben keinerlei krankhafte Erscheinungen feststellen können. Das Tier sei in einem sehr guten Ernährungszustande und das Allgemeinbefinden ein gutes. Temperatur, Puls und Atmung bewegten sich in normalen Grenzen. Die Futeraufnahme sei gut. Das Euter sei schlaff, welk und abnorm klein, atrophische Verhärtungen fanden sich nicht im Euter. Die Sekretion sei gering, an dem Abend der Untersuchung seien etwa 1,5 Liter Milch gemolken worden. Der Geschmack der Milch sei ein widerlich salziger. Die abnorm zusammengesetzte Sekretion des Euters und der Euterschwund dürften vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß die Kuh längere Zeit nur einmal täglich und während der Krankheit der Frau M. unregelmäßig und vielleicht oft gar nicht oder nur schlecht ausgemolken worden sei.

Aus wissenschaftlichem Interesse verfolgte Amberger diesen Fall näher. Der Gehalt an fettfreier Trockensubstanz war noch weiter gesunken. Der Rückgang erfolgte lediglich auf Kosten des Milchzuckers; merkwürdigerweise hielt sich die Stickstoffsubstanz auf gleicher Höhe. In diesem Falle waren also die hochdispersen Anteile die unbeständigsten. Auch der Brechungsindex war geringer, Asche und Chlorgehalt dagegen wieder erhöht. Da eine solche Kuh unrentabel ist, so wurde sie bald darauf vom Besitzer zur Schlachtbank geführt. Der Bericht des zuständigen Tierarztes, der beim Öffnen des geschlachteten Tieres zugegen war, lautet folgendermaßen:

„Es konnten weder am Euter noch an sonstigen Organen krankhafte Veränderungen festgestellt werden. Das Tier war demnach auch zur Zeit der abnormen Milchsekretion vollkommen gesund. Die außergewöhnliche Beschaffenheit der Milch war durch andere Umstände veranlaßt.“

¹⁾ Diese Zeitschrift 1915, 30, 16.

Im Anschluß hieran wird von Amberger noch auf einen anderen Fall aus der Praxis hingewiesen, wo durch Mangel an Futter abnorm zusammengesetzte Milch erzeugt wurde, während bei reichlicher Fütterung von dem gleichen Milchtier Milch geliefert wurde, die die gewohnte normale Zusammensetzung aufwies. Amberger hat die Milchproben ausführlich auf alle Bestandteile hin untersucht. Was uns aber auffällt ist, daß die Katalaseprobe nicht ausgeführt wurde. Der Mineralstoffgehalt dieser Milchproben war den geringsten Schwankungen unterworfen, nur war der Chlorgehalt außergewöhnlich hoch und betrug 43,6—44,7% der Asche. Letzterer Umstand läßt uns vermuten, daß diese Milchproben trotz der abnormen Gehaltszahlen dennoch hinsichtlich Gefrierpunkt normal oder beinahe normal waren. In dieser Annahme werden wir noch weiter bestärkt, nachdem wir auf Grund des von Amberger ermittelten Milchzuckergehaltes der Milch und des auf Chlornatrium umgerechneten Chlorgehaltes in der Asche den Gefrierpunkt berechnet haben.

Über einige Fälle aus unserer Praxis, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den von Amberger angeführten aufweisen, soll hier kurz berichtet werden. Es handelt sich um Marktmilchproben, die auf Grund der üblichen Milchanalyse und der Refraktion als gewässert anzusprechen, nach dem Gefrierpunkt aber als normal zu bezeichnen gewesen wären. Somit war uns von vornherein klar, daß trotz der abnormen Zusammensetzung die Milchproben doch nicht durch Wasserzusatz verfälscht waren, die abnorme Beschaffenheit vielmehr irgendwo anders ihren Grund haben mußte. Die Untersuchung der zugehörigen Stallproben hat diese Annahme immer bestätigt, indem nachgewiesen wurde, daß es sich um Milch kranker Kühe oder um ein Erzeugnis von sonstwie abnormer Beschaffenheit handelte. Der Übersichtlichkeit halber sind im folgenden die Untersuchungsergebnisse einiger solcher Fälle aus der Praxis zusammengestellt:

Nr.	Bezeichnung der Milch	Zeit der Entnahme (Morgmilch)	Spez. Gewicht	Fett	Trocken-substanz	Fettfreie Trocken-substanz	Milchzucker	Fett- und zuckerfreie Trocken-substanz	Refraktion	Katalase	Gefrierpunkt	Säurezahl	Bemerkungen
1	Marktmilch von 2 Kühen . . .	15. VIII. 1916	28,7	3,3	11,41	8,10	4,37	3,74	37,6	50	0,54	5,2	—
2	Stallmilch Kuh 1	16. VIII. 1916	28,8	3,0	11,06	8,06	4,48	3,58	38,2	4	0,54	6,5	salzig
3	„ Kuh 2	16. VIII. 1916	29,3	4,3	12,74	8,44	4,39	4,05	37,7	60	0,55	6,0	salzig
4	Marktmilch von 2 Kühen . . .	21. IX. 1916	31,0	3,5	12,21	8,71	4,35	4,36	37,5	30	0,54	6,5	—
5	Stallmilch Kuh 1	22. IX. 1916	29,2	4,7	13,20	8,50	4,48	4,02	38,2	14	0,545	6,5	—
6	„ Kuh 2	22. IX. 1916	29,3	3,5	11,80	8,30	3,98	4,32	35,6	25	0,55	5,3	salzig
7	Marktmilch von 2 Kühen . . .	18. X. 1916	29,4	4,5	13,00	8,50	4,44	4,06	38,0	—	0,525	7,0	—
8	Stallprobe von 2 Kühen . . .	19. X. 1916	30,6	5,3	14,26	8,96	4,60	4,36	38,8	15	0,530	7,4	—
9	Stallprobe Kuh 1	20. X. 1916	31,9	4,7	13,87	9,17	4,64	4,53	39,0	5	0,55	7,8	—
10	„ Kuh 2	20. X. 1916	28,1	5,1	13,40	8,30	4,44	3,86	38,0	40	0,525	6,6	—

Bei der Marktmilch Nr. 1 mußte auf Grund des geringen Gehaltes an fettfreier Trockensubstanz und der niedrigen Refraktionszahl von 37,6, bei der Markt-

milch Nr. 4 ausschließlich auf Grund der niedrigen Refraktionszahl von 37,5 auf eine Verfälschung durch Wasserzusatz in beiden Fällen bis etwa 5% geschlossen werden. Die Gefrierpunkterniedrigung war bei beiden Proben normal, also war eine Wässerung ausgeschlossen. Daraus ergab sich die Schlußfolgerung, daß in beiden Fällen es sich um Kühe handeln mußte, welche Milch von abnormer Refraktionszahl lieferten. Die Untersuchung der entsprechenden Stallproben hat diese Schlußfolgerung bestätigt, indem die Stallproben von den beiden Kühen Nr. 3 und 6 abnorm niedrige Refraktionszahlen aufwiesen, während der Gefrierpunkt beider Proben normal, der Geschmack aber salzig war.

Anders lagen die Verhältnisse bei der Marktmilch Nr. 7. Bei dieser Probe mußte aus den Untersuchungsergebnissen, besonders aus dem niedrigen Gehalt an fettfreier Trockensubstanz, aus der Refraktionszahl und aus dem Gefrierpunkt eine Verfälschung durch Wasserzusatz bis etwa 5% angenommen werden. Daher wurde die Entnahme einer Stallprobe angeordnet. Aus der Verschiedenheit in den Gehaltszahlen beider Proben, besonders aus der Differenz in der fettfreien Trockensubstanz und der Refraktion, die nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch als Grundlagen der Berechnung der Größe eines stattgehabten Wasserzusatzes anzuwenden sind, ergab sich ein Wasserzusatz von etwa 4%. Der Gefrierpunkt war aber bei beiden Proben fast gleich, die Differenz betrug nur 0,005°. Bei einer 4%-igen Wässerung müßte diese Differenz aber 0,02° betragen, also viermal größer sein. Nach den Ergebnissen der Kryoskopie war somit ein Wasserzusatz ausgeschlossen. Eher mußte die Annahme gemacht werden, daß eine der Kühe eine Milch von niedrigem Gefrierpunkt und niedriger Refraktionszahl lieferte. Es wurde daher die Einlieferung der Stallproben der einzelnen Kühe angeordnet. Die Untersuchung der Einzelprobe hat die gemachte Annahme vollauf bestätigt, indem sie ergab, daß die Milch von Kuh Nr. 2 (Stallprobe Nr. 10) eine niedrige Refraktionszahl sowie niedrigen Gefrierpunkt aufwies. Spätere Nachforschungen haben dann ergeben, daß die Marktmilch Nr. 7 fast ausschließlich Milch von Kuh Nr. 2 (Milch Nr. 10) und nur wenig Milch von Kuh Nr. 1 (Milch Nr. 9) enthielt. Bei allen diesen Beispielen hat uns die Kryoskopie vorzügliche Dienste geleistet, indem sie uns eine richtige Beurteilung der Milch ermöglichte.

Schon die wenigen hier angeführten Beispiele zeigen, welche Bedeutung der Kryoskopie in der Milchanalyse zukommt. Die Sicherheit, die man in der Beurteilung einer Milch bei Heranziehung der Gefrierpunktsbestimmung erhält, macht unter Umständen die Erhebung einer Stallprobe entbehrlich. Unsererseits wird zwar nie auf die Erhebung einer Stallprobe verzichtet. In Fällen aber, wo eine hinsichtlich Gehalt abnorme Milch mit normalem Gefrierpunkt Veranlassung zur Anordnung einer Stallprobe gibt, erwähnen wir hierbei auch den eigentlichen Grund der Probenentnahme, in dem Sinne, daß es sich nicht um Verdacht der Verfälschung, sondern um das Bestreben, die Ursache der abnormen Beschaffenheit der Milch festzustellen, handelt. Auf diese Weise wird unschuldigen und ehrlichen Landwirten, die selbst zuweilen keine Ahnung davon haben, daß die von ihnen gelieferte Milch von abnormer Beschaffenheit ist, eine peinliche Verdächtigung erspart.

Gegen die Kryoskopie wird, wie schon ausgeführt worden ist, hie und da der Einwand erhoben, es könnte durch Zusatz von Kochsalz oder von anderen Stoffen mitunter gelingen, an Stelle einer gewässerten eine pathologisch veränderte Milch vorzutäuschen. Abgesehen davon, daß eine Täuschung der mit der Probenentnahme

betrachten, geübten Persönlichkeiten kaum wahrscheinlich ist, werden durch solche Zusätze Refraktion, Geschmack usw. ebenso beeinflusst. Auf derartige Einwände kann mit den trefflichen Worten Tillmans' geantwortet werden, daß es auch einem Schwarzkünstler ohne Präzisionswaage nicht gelingen wird, eine Täuschung herbeizuführen.

Daß die Ergebnisse der üblichen chemischen Analyse selbst unter Heranziehung der Refraktion des Chlorcalciumserums nicht immer zur einwandfreien Beurteilung einer Milch ausreichen, ist von verschiedenen Forschern schon mehrmals dargelegt worden. Ackermann selbst hat in seiner neuen Arbeit „Neue Beiträge zur Beurteilung der Milch“¹⁾ auf diesen Umstand hingewiesen. Er glaubt, daß für die richtige Beurteilung das Verhältnis zwischen dem Gehalt an fett- und zuckerfreier Trockensubstanz und Milchzucker besonders wertvoll sei. Vorläufig berechnet er den Wert der fett- und zuckerfreien Trockensubstanz. Dies geschieht folgendermaßen: Nach einer von ihm aufgestellten Tabelle kann aus der Refraktionszahl des Serums der Milchzuckergehalt abgelesen werden. Zieht man den so ermittelten Zuckergehalt von der fettfreien Trockensubstanz ab, so erhält man die fett- und zuckerfreie Trockensubstanz. In seinen Schlußfolgerungen gibt Ackermann unter anderem an, daß man in den meisten Fällen, wenn es sich um Milch von euterkranken Kühen handelt, nur den Milchzuckergehalt vermindert findet, der Gehalt an Eiweißstoffen aber als normal sich ergibt; deshalb fällt auch die Gehaltszahl für fett- und zuckerfreie Trockensubstanz nicht unter den Wert 4. Bei Wasserzusatz nimmt selbstverständlich der Gehalt an allen Bestandteilen gleichmäßig ab. Ackermann empfiehlt deshalb, für sämtliche Milchproben, deren Refraktionszahl abnorm tief liegt, die fett- und zuckerfreie Trockensubstanz zu berechnen. Diese besteht aus den Eiweißstoffen, (Casein, Albumin usw.) und aus den als konstant anzunehmenden Mineralstoffen. Bei dieser neuen Betrachtungsweise fallen somit hauptsächlich die Eiweißstoffe ins Gewicht.

In seinen rein wissenschaftlichen kolloidchemischen Betrachtungen über die Milch kommt G. Wiegner zu folgenden allgemeinen Endergebnissen²⁾:

Die Bestandteile der Kuhmilch treten um so konstanter in ihrer Menge auf, in je höherer und gleichmäßigerer Zerteilung sie in der Milch auftreten.

Nach Wiegner nimmt die Zerteilung Hand in Hand mit Abnahme der Schwankung und Zunahme der Eignung für physikalisch eindeutige Messungen in folgender Reihe von oben nach unten zu:

Fett	grob zerteilt
Casein und Albumin	kolloid zerteilt
Milchzucker und Asche	maximal zerteilt.

Das Chlorcalciumserum, das Tetraserum II sind deshalb so geeignet für die Milchbeurteilung, weil sie die hochdispersen, konstantesten Milchbestandteile enthalten. Nun ist ja die Gefrierpunktserniedrigung ebenfalls nur durch die hochdispersen Stoffe (Milchzucker und Salze) bedingt, sie hat aber vor der Refraktion den Vorteil, daß zu ihrer Ermittlung die Herstellung eines Serums überhaupt nicht notwendig ist, da die Eiweißstoffe und das Fett den Gefrierpunkt in keiner Weise beeinflussen. Nach Wiegner gehören also die Eiweißstoffe und das Fett zu den schwankenden Bestand-

¹⁾ Mitteilungen d. Schweizer. Gesundheitsamtes 1916, 7, 319.

²⁾ Diese Zeitschrift 1914, 27, 431.

teilen, selbst bei gesunder Milch. Der Vorteil des Chlorcalciumserums besteht eben darin, daß dabei diese Stoffe ausgeschieden werden und nur die hochdispersen, wie Milchzucker und Salze, zurückbleiben. Bei kranker Milch geht der Milchzuckergehalt zurück, wird also ebenfalls unkonstant. Es ist gar nicht einzusehen, weshalb in solchen Fällen, wie Ackermann annimmt (a. a. O., S. 324), der Gehalt an Albuminsubstanzen aber normal bleiben soll. Dies würde mit den wohl begründeten Ansichten Wiegner's und Cornalba's im Widerspruch stehen. Wir haben die fett- und zuckerfreie Trockensubstanz bei einer Reihe kranker Milchproben berechnet und vermögen in dieser neuen Zahl keinen Vorteil zu erblicken. Die Refraktionszahl sagt uns wesentlich mehr. Besitzt dagegen eine Milchprobe, deren Refraktionszahl abnorm niedrig ist, einen normalen Gefrierpunkt, so darf mit Sicherheit geschlossen werden, daß hier nicht eine gewässerte, sondern eine kranke Milch vorliegt. In solchen Fällen ist der Gefrierpunkt des Chlorcalciumserums trotz der abnormen Refraktionszahl normal. Die Erklärung für diese Erscheinung ist bereits oben gegeben worden.

Nach Wiegner und Cornalba ist der fett- und caseinfreie oder noch besser auch eiweißfreie Trockenrückstand von allen analytisch bekannten Werten der Milch den kleinsten Schwankungen unterworfen. Bei kranker Milch ist dies nicht der Fall. Würde man aber neben oder an Stelle der Konstanz der analytischen Werte, worunter doch wohl nur die Gehaltsangaben zu verstehen sind, von der Konstanz gewisser physikalischer Eigenschaften, wie des osmotischen Druckes, des Gefrierpunktes sprechen, so hätte diese Regel auch noch für kranke Milch ihre Gültigkeit, denn wir sahen, daß solche Milchproben von euterkranken Kühen trotz ihres schwankenden Gehaltes an hochdispersen Stoffen dennoch bis zu einem gewissen Grade der Krankheit einen normalen Gefrierpunkt aufweisen. Die Refraktion, die fast ausschließlich durch den Milchzuckergehalt bedingt ist, läßt uns in solchen Fällen im Stich, denn sie macht alle Schwankungen des Milchzuckergehaltes mit. Im Gefrierpunkt kommt aber neben der Menge der Stoffe auch ihre molekulare Größe und ihr Bindungszustand zum Ausdruck, welche Verhältnisse bei kranker Milch sich derart zu verändern scheinen, daß der Gefrierpunkt doch noch normal bleibt.

Der Kryoskopie wird noch entgegengehalten, das Verfahren sei sehr zeitraubend. Gegen diesen Einwand hat sich schon Winter heftig gewehrt. Wenn ich nicht irre, ist zuerst von ihm behauptet worden, daß ein mit diesem Verfahren gut vertrauter Analytiker etwa 100 Gefrierpunktsbestimmungen im Tag auszuführen imstande ist. Diese Angabe ist vielfach bezweifelt worden. Nach unseren eigenen Erfahrungen gelingt es mit Leichtigkeit in 1—1½ Stunden 12 Gefrierpunktsbestimmungen in der Milch auszuführen. Nun ist es ja gar nicht nötig, sämtliche Milchproben nach dieser Richtung zu untersuchen; es sollte dies nur bei verdächtigen und abnormen Proben geschehen. Für eine nutzbringende Anwendung des Verfahrens muß es zuerst gut eingeübt werden, denn erst bei einer sicheren Handhabung gelingt es, die Bestimmung rasch und zuverlässig durchzuführen.

Refraktion und spezifisches Gewicht des Chlorcalciumserums.

Die Frage, inwiefern die Bestimmung des spezifischen Gewichtes und der Refraktion nebeneinander berechtigt sind, ist schon verschiedentlich untersucht worden. Kreis¹⁾ betont als wichtige Vorzüge der Refraktionsbestimmung des Chlorcalcium-

¹⁾ Ber. über die Tätigkeit des Kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt 1907, S. 34.

serums gegenüber der bis dahin ausgeführten Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Essigsäure- und Spontanserums die viel raschere und einfachere Ausführbarkeit und die gleichmäßigeren Ergebnisse. Wiegner¹⁾ ist auf Grund experimenteller Versuche und theoretischer Betrachtungen zu dem Ergebnis gekommen, daß die Bestimmung des spezifischen Gewichtes und der Refraktionszahl beim Chlorcalciumserum wissenschaftlich gleichberechtigt seien, und hat für die gegenseitige Umrechnung Formeln angegeben. Ackermann²⁾ hat die Richtigkeit der Wiegner'schen Forschungen bestätigt und hat für den Abschnitt Milch der dritten revidierten Auflage des Schweizerischen Lebensmittelbuches eine Tabelle zur Ermittlung der Refraktionszahlen aus dem spezifischen Gewicht des Chlorcalciumserums der Milch und zur Berechnung des Wasserzusatzes aufgestellt. Pfyl und Turnau³⁾ haben ebenfalls die Frage, ob die Lichtbrechung oder das spezifische Gewicht der Seren empfindlicher sind, einer gründlichen Untersuchung unterworfen. Sie haben in einer größeren Reihe von Milchsorten die Lichtbrechung der verschiedenen Seren mit den zugehörigen spezifischen Gewichten verglichen. Die Frage nach der Empfindlichkeit wird von ihnen dahin beantwortet, daß wenigstens für den Gehalt an Eiweißstoffen die Lichtbrechung wesentlich empfindlicher ist als das spezifische Gewicht. Da aber das Chlorcalciumserum ein nahezu eiweißfreies Serum darstellt, so sind bei diesem Serum beide Verfahren gleichwertig.

Da die Anschaffungskosten des Eintauchrefraktometers und des nötigen Zubehörs für die Refraktometrie ziemlich hoch sind, so könnte in solchen Laboratorien, wo ein Eintauchrefraktometer nicht zur Verfügung steht, das spezifische Gewicht des Serums bestimmt werden. Aus der Tabelle von Ackermann kann dann die dem gefundenen spezifischen Gewichte entsprechende Refraktometerzahl abgelesen werden. Pfyl und Turnau haben in der hier mehrfach erwähnten Arbeit eine einfache Regel angegeben, nach der aus dem spezifischen Gewichte des Serums die Refraktion und umgekehrt aus der Refraktion das spezifische Gewicht leicht ermittelt werden kann. Werden nach dieser Regel von der Refraktionszahl des Chlorcalciumserums 13,9

Fig. 5.
Beziehungen der Refraktionszahl und des spezifischen Gewichtes des Chlorcalciumserums.

abgezogen, so erhält man das spezifische Gewicht des Serums in Laktodensimetergraden ausgedrückt. Das so erhaltene spezifische Gewicht bezieht sich auf Wasser von 4° (d_{4}^{15}). In der Praxis wird aber das spezifische Gewicht bei 15° bestimmt und auf Wasser von 15° bezogen (d_{15}^{15}). Auch in der Tabelle von Ackermann sind die spezifischen Gewichte so angegeben. Um die Werte der Ackermann'schen Tabelle zu erhalten, genügt es, die Refraktionszahl um 13 zu vermindern. Die so erhaltene Zahl gibt das

¹⁾ Diese Zeitschrift 1910, 20, 70.

²⁾ Mitteilungen d. Schweizer. Gesundheitsamtes 1910, 1, 269.

³⁾ Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1912, 40, 263.

spezifische Gewicht des Serums (d_{4}^{25}) unmittelbar in Laktodensimetergraden an. Diese Beziehung zwischen dem spezifischen Gewicht und der Refraktion des Chlorcalciumserums wird durch vorstehende Tafel (Fig. 5) zum Ausdruck gebracht, welche die Ermittlung der Refraktionszahl aus dem spezifischen Gewicht und umgekehrt, sowie eines etwaigen Wasserzusatzes mit Leichtigkeit ermöglicht. Der Ermittlung des Wasserzusatzes ist eine ursprüngliche Refraktionszahl von 39 zugrunde gelegt.

Die Laktodensimetergrade sind von derselben Größenordnung wie die Refraktometergrade und es kommt ihnen auch annähernd dieselbe Messungsgenauigkeit zu.

Diejenigen, die bei Reihenuntersuchungen das spezifische Gewicht des Serums mit dem Greiner'schen Serumäräometer bestimmen und dann aus dem spezifischen Gewicht auf Grund einer Tabelle die entsprechende Refraktionszahl ermitteln, werden diese einfache Regel besonders zu schätzen wissen.

Mitteilungen aus der Praxis des Chemischen Untersuchungsamtes der Stadt Dresden.

Von

A. Beythien, H. Hempel, P. Pannwitz und E. Spreckels.

[Eingegangen am 10. Mai 1917.]

Wie wohl der Mehrzahl der Nahrungsmittelchemiker sind auch uns im Verlaufe des letzten Jahres häufiger als sonst eß- oder trinkbare oder wenigstens zum Verzehren bestimmte Erzeugnisse begegnet, deren Zusammensetzung nicht unsere Zufriedenheit erregte, sondern eher erstauntes Kopfschütteln oder Mißfallen hervorrief, zu deren Bekämpfung aber das Nahrungsmittelgesetz nicht ausreichte, ja oft sogar die vortreffliche Bekanntmachung gegen irreführende Bezeichnungen versagte. Es sei uns gestattet, einige Gegenstände, deren Untersuchung oder Beurteilung ein gewisses allgemeines Interesse darbietet, nachstehend kurz zu besprechen.

I. Fleisch- und Wurstwaren.

Von den Fleischwaren besitzen die in Blechdosen eingefüllten Konserven insofern eine gewisse Ähnlichkeit mit den Würsten, als auch auf sie das Wort Jean Paul's „Nur ein Gott weiß, was darin ist“ Anwendung finden kann. Sie sind aber insofern schlechter daran, als die nähere Zusammensetzung der Würste auch beim Verzehren dem Käufer ein ewiges Rätsel bleibt, während er beim Öffnen der Konservendose oft selbst erkennt, daß er zwar viel Brühe, Knochen und Gemüse, aber wenig Fleisch erhielt. Im Hinblick auf den Umstand, daß die Jahresberichte der Untersuchungsämter zahlreiche Beispiele hierfür enthalten, und daß durch den Kennzeichnungszwang der größten Übervorteilung ein Riegel vorgeschoben ist, sehen wir von einem näheren Eingehen auf diesen Gegenstand ab und beschränken uns auf die Mitteilung einiger sonderbarer Fälle:

Gekochtes Rindfleisch in Suppe, ein schwedisches Gericht, das in runden Blechdosen mit der Inschrift „Landskrona Svinlagterier“ zum Preise von 1,90 Mk. für