(Aus dem physiologischen Institute in Bonn)

Die quantitative Bestimmung von Fetten, Seifen und Fettsäuren in thierischen Organen ¹⁾).

Von

Dr. phil. **C. Dormeyer.**

Es scheint eine allgemein anerkannte Annahme zu sein, dass zur Bestimmung der Fette in thierischen Organen die Extraction mittelst Aether eine zuverlässige und genaue Methode ist. Die Angaben in der Litteratur lauten dahin, dass man zur Bestimmung des Fettgehaltes die getrockneten Organe mit heissem Aether extrahiren soll. Während nun schon die Angaben über die verschieden lange Zeitdauer der Extraction es vermuthen lassen, dass unter sonst gleichen Bedingungen demgemäss auch die Menge der Extracte veränderlich ist, so findet man doch bis in die neuere Zeit jene Methode zur Bestimmung der Fette angewandt. Auf die Frage nun, worauf sich denn die Genauigkeit dieser Methode gründe, welche Kriterien man habe, dass das Fett mittelst siedenden Aethers aus den Organen vollständig herausgeholt werden kann, darauf sucht man in der Litteratur vergebens nach einer Antwort. Ich brauche nun kaum darauf hinzuweisen, dass es unbedingt nothwendig ist, die Genauigkeit jener Methode in ihrer Grundlage zu prüfen, da die Möglichkeit einer genauen Bestimmung dieses Reservestoffes der Organe von grundsätzlicher Bedeutung ist.

Zuerst hat Pflüger²⁾ auf die Schwierigkeit aufmerksam gemacht, der man begegnet, wenn man getrocknetes Pferdefleisch mit siedendem Aether an Extract erschöpfen will. Er präcisirte seine Meinung über obige Methode dahin: „Aus allen angeführten Gründen halte ich die genaue quantitative Bestimmung der Fette

---

1) In einer vorläufigen Mittheilung (Pf. Arch. 61, 341) habe ich das Wesentliche dieser Arbeit schon bekannt gegeben.

2) Pf. Arch. 51, 277.

mit unseren heutigen Methoden nicht bloß für schwierig, sondern für unausführbar.“ Später hat Argutinsky¹⁾ jene Frage bei der Bestimmung des Fettgehaltes von in vacuo getrocknetem Ochsenfleisch wieder aufgenommen. Er theilt mit, dass er manchmal genöthigt gewesen sei, das getrocknete Fleisch eine Woche lang zu extrahiren und zwar betrug nach ihm der Fettgehalt des Aetherextractes aus 10 bis 20 g Substanz am fünften und sechsten Tage nur wenige Milligramme. „Auf diesem Punkte angelangt habe ich in der Regel die Extraction als beendet angesehen, da es mir auch nach weiter fortgesetzter Extraction nie gelang, den Aether frei von jeglichem Rückstand zu erhalten.“ Obwohl nun Argutinsky selbst die Berechtigung des Einwandes, dass die Summe von selbst Milligrammen des Extractes viele Tage beobachtet eine wohl zu berücksichtigende Menge bilden, für berechtigt erachtet, so meint er doch, „dass eine eine Woche dauernde Fettextraction mit schnell circulirendem, warmen Aether im Soxhlet'schen Apparate wohl die Grenze dessen erreicht, was man practisch verlangen kann.“ Es wird sich jedoch aus den in der folgenden Aufstellung I mitgetheilten Ergebnissen erweisen, dass selbst Argutinsky noch weit davon entfernt war, den Fettgehalt des Fleisches erschöpft zu haben.

Ich werde nunmehr die in den folgenden drei Aufstellungen I A, B, C mitgetheilten Versuchsergebnisse näher erläutern und einer eingehenden Betrachtung unterziehen.

Verschiedene Muskeln — vergl. Aufstellung I — eines im Stoffwechselgleichgewicht befindlichen 30 kg schweren Hundes wurden auf das Sorgfältigste, dies betone ich besonders, von allen makroskopisch sichtbaren Fetttheilchen befreit und dann in vacuo über Schwefelsäure getrocknet. Die Muskeln, welche sich so recht schnell und ohne merkbare Veränderung trocknen lassen, wurden nunmehr nach Möglichkeit zerkleinert. Dies gelingt jedoch, hierin bestätige ich Argutinsky's Angabe, wegen des vorhandenen Fettes immer nur ganz annähernd. Das verhältnissmäßig grobe Pulver wurde nunmehr in eine Papierhülse gefüllt und mehrere Stunden mit siedendem Aether im Soxhlet'schen Apparate behandelt. Der Aether circulirte so schnell als zulässig war; er hatte im Apparate eine Temperatur von 30°/32°. Der

---

1) Pf. Arch. 55, 6.

I.

A. Behandlung von

50 g *Musc. gluteus*

während einer Versuchszeit von 863 Stunden mit heissem Aether.

Behandlung vor der Extraction	Dauer der Ex- traction Stund.	Aether- extract g	Durch Verseifung erhalten
Pulverisirt	15	3,1500	
"	14	0,4900	
"	10	0,2600?	
"	26	0,0900	
Nicht pulvers.	20	0,0399	
"	31	0,0502	
"	33	0,0395	0,0200 g Fettsäuren, 0,0101 g Cholesterin.
Pulverisirt	30	0,0853	0,0691 g Fettsäuren.
"	42	0,0900	
"	46	0,1116	
"	33	0,0592	0,0502 g Fettsäuren.; davon 0,0201 g als freie Fettsäuren.
"	45	0,0750	
"	39	0,0600	
350 St. ohne Pulverisi- sation unter Aether.		0,0047	0,0005 g Fettsäuren.
Nicht pulvers.	37	0,0420	
Pulverisirt	39	0,0729	
"	39	0,0522	0,0351 g Fettsäuren, 0 0030 g Cholesterin.
"	37	0,0649	
Nicht pulvers.	57	0,0300	
"	46	0,0150	
"	56	0,0150	0,0080 g Fettsäuren, 0,0030 g Cholesterin.
"	37	0,0085	0,0045 g Fettsäuren, 0,0015 g Cholesterin.
"	37	0,0066	Spur Cholesterin.
Pulverisirt	51	0,0245	
"	43	0,0170	0,0100 g Fettsäuren, Spur Cholesterin.
Summa	863	4,9540	

zu diesem Zwecke dienende Aether war rein und enthielt keine nachweisbare Menge von Säure. Durch diese erste Extraction erhielt man, wie sich aus den drei Aufstellungen I ergibt, etwa $\frac{3}{5}$ der gesamten extrahirten Menge des Fettes. Alsdann wurde nach Entfernung des Aethers die Masse auf's Neue pulverisirt und schon jetzt eine ziemliche Feinheit des Pulvers erreicht. Die Extraction mit Aether wurde alsdann wiederholt. Dieses Verfahren wurde 3—4 Mal vorgenommen und dabei immer noch durchaus bemerkenswerthe Mengen von Aetherextract erhalten. Um den Einwand zu beseitigen, als hätte man durch ein einmaliges, aber weiter-

I.

B. Behandlung von

38 g *Musc. quadriceps* (rechts)

während einer Versuchszeit von 871 Stunden mit heissem Aether.

Behandlung vor der Extraction	Dauer der Ex- traction Stund.	Aether- extract g	Durch Verseifung erhalten
Pulverisirt	20	2,0700	
"	27	0,6500	
"	42	0,1300	
Nicht pulvers.	18	0,0220	
"	35	0,0250?	
"	16	0,0123	0,0041 g Fettsäuren, 0,0040 g Cholesterin.
Pulverisirt	39	0,1032	0,0900 g Fettsäuren, 0,0150 g Cholesterin.
Nicht pulvers.	41	0,0501	
Pulverisirt	40	0,1055	
"	35	0,1091	
"	41	0,0793	
"	41	0,0422	0,0301 g Fettsäuren.
"	16	0,0291	0,0200 g Fettsäuren.
350 St. ohne Pulverisation unter Aether.		0,0015	Fettsäuren nicht vorhanden.
Pulverisirt	40	0,0381	0,0354 g Fettsäuren.
"	35	0,0438	
"	54	0,0488	0,0300 g Fettsäuren; davon 0,0120 g als freie Fettsäuren.
"	71	0,0513	
"	45	0,0357	
"	57	0,0288	0,0234 g Fettsäuren.
"	63	0,0146	
"	54	0,0132	0,0081 g Fettsäuren.
"	41	0,0092	Fettsäuren und Spur Cholesterin.
Summa	871	3,7121	

gehenderes Pulverisiren die ganze Menge des in den 3—4 letzten Malen erhaltenen Aetherextractes auf einmal gewinnen können, genügt es darauf hinzuweisen, dass auf das Pulverisiren von je vier Gramm Substanz etwa eine halbe Stunde verwandt wurde. Und weiter, da es nicht gelingt, das Bindegewebe im Mörtel hinreichend zu zerkleinern, so wurde dieses mittels einer Scheere zerschnitten. Hierbei wurde sogar, um kleine Theilchen des Bindegewebes aufzufinden, eine Lupe benutzt. Wie die drei Aufstellungen I ergeben, war der Aetherextract immer noch erheblich, aber stets abnehmend. Es wurde nunmehr das Pulverisiren ausgesetzt und das Pulver, welches schon einen bedeutenden Grad von Feinheit erlangt hatte, weiter mit Aether extrahirt. Auch hierbei wurden immer noch nicht zu

I.

C. Behandlung von
32 g *Musc. quadriceps* (links)

während einer Versuchszeit von 1044 Stunden mit beissem Aether.

Behandlung vor der Extraction	Dauer der Ex- traction Stund.	Aether- Extract g	Durch Verseifung erhalten
Pulverisirt	25	1,79	
"	50	0,46	
"	25	0,10	
Nicht pulveris.	34	0,0617	0,0451 g Fettsäuren, 0,0100 g Cholesterin.
Pulverisirt	43	0,1495	
Nicht pulveris.	40	0,0600	0,0400 g Fettsäuren, 0,0120 g Cholesterin.
Pulverisirt	53	0,1092	0,0930 g Fettsäuren, Spur Cholesterin.
"	35	0,0621	
"	42	0,0600	
"	55	0,0348	0,0303 g Fettsäuren; davon 0,0090 g als freie
"	26	0,0221	Fettsäuren.
350 St. ohne Pulverisation unter Aether.			[den.
Nicht pulveris.	39	0,0036	Glycerinreaction fraglich, Fettsäuren vorhanden.
Pulverisirt	31	0,0275	0,0240 g Fettsäuren, Spur Cholesterin.
"	42	0,0237	
"	61	0,0265	
"	53	0,0334	0,0260 g Fettsäuren; davon 0,0102 g als freie
"	46	0,0187	Fettsäuren.
"	55	0,0161	
"	55	0,0087	0,0050 g Fettsäuren.
"	37	0,0074	0,0048 g Fettsäuren, Spur Cholesterin.
"	41	0,0080	
"	58	0,0040	
"	60	0,0065	
Sehr lange pulverisirt	38	0,0020	
Summe	1044	0,0151	0,0120 g Fettsäuren, Spur Cholesterin.
		3,1006	

vernachlässigende Mengen Aetherextract gewonnen. Setzte man dies Verfahren, also ohne das Organpulver vorher zu pulverisiren, fort, so nahm der Extract auch langsam ab. Wurde jedoch dasselbe vor der Behandlung mit Aether auf's Neue pulverisirt, so ergab sich die bemerkenswerthe Thatsache, dass durch den Aether 2,5, ja 8,5 mal so viel Extract herausgeholt wurde, als beim vorhergehenden Male, wo das Fleisch nicht pulverisirt worden war. Dieses Verfahren wurde noch mehrmals wiederholt und zwar mit dem verhältnissmässig gleichem Erfolge. Das Fleischpulver hatte schon, bevor die erste

Hälfte einer Versuchsreihe beendet war, einen solchen Grad von Feinheit erreicht, dass bei dem jedesmaligen erneuten Pulverisiren die grössere Feinheit des Pulvers nicht ermittelt werden konnte. Es steht jedoch fest, dass nur durch das erneute Pulverisiren eine weitere Menge Extract gewonnen werden konnte und demnach auch die Muskelsubstanz durch das Pulverisiren einen höheren Grad von Feinheit erreicht haben musste. Denn ward nunmehr weiterhin das Pulverisiren ausgesetzt, so sank der Extract sogleich bedeutend und stieg dagegen im Verhältniss zu jenem bei erneutem Pulverisiren. Obiges Verfahren wurde fortgesetzt in der Erwartung, dass man schliesslich doch zum Ziel gelangen würde. Trotz der ganz bedeutenden Extractionszeit von 900—1000 Stunden¹⁾ gelang es aber nicht, das Fleisch an Aetherextract zu erschöpfen, denn die zum Schlusse erhaltenen Mengen sind doch noch so bedeutend, dass sie unbedingt in Betracht kommen müssen. Wenn sich nun auch unter Zugrundelegung der in der folgenden Aufstellung II angegebenen Zahlen ermitteln lassen würde, wie lange Zeit man noch aufwenden müsse, um den zu begehenden Fehler möglichst klein zu machen, so ist dies aus practischen Gründen unausführbar.

II.

In je 10 Stunden aus:

50 g M. gluteus erhalten		38 g M. quadriceps erhalten		32 g M. quadriceps erhalten	
an Aether- extract g	Berechnet aus	an Aether- extract g	Berechnet aus	an Aether- extract g	Berechnet aus
2,10	15 St. (Pulv.)	1,035	20 St. (Pulv.)	0,716	25 St. (Pulv.)
0,13 (?)	60 " "	0,113	69 " "	0,075	75 " "
0,015	84 " (Nicht pulv.)	0,0093(?)	69 " (Nicht pulv.)	0,0181	34 " (Nicht pulv.)
0,024	118 " (Pulv.)	0,0265	39 " (Pulv.)	0,0348	43 " (Pulv.)
0,0160	117 " "	0,0122	41 " (Nicht pulv.)	0,0150	40 " (Nicht pulv.)
		0,0286	75 " (Pulv.)	0,02	88 " (Pulv.)
		0,0153	97 " "	0,0095	123 " "
Substanz 350 St. unter Aether		Substanz 350 St. unter Aether		Substanz 350 St. unter Aether	
0,0113	37 St. (Nicht pulv.)	0,011	129 St. (Pulv.)	0,0071	39 St. (Nicht pulv.)
0,0165	115 " (Pulv.)	0,0075	116 " "	0,0063	134 " (Pulv.)
0,0043	103 " (Nicht pulv.)	0,0036	120 " "	0,0028	154 " "
0,0023	130 " "	0,0023	96 " "	0,0014	133 " "
0,0044	94 " (Pulv.)			0,0015	156 " "

1) Ich will nicht unerwähnt lassen zu bemerken, dass diese Anzahl von Stunden einer Versuchsdauer von vielen Monaten entsprechen, da ja wegen der Feuergefährlichkeit des Aethers die Extraction nicht während der Nacht fortgesetzt werden durfte.

Aus dieser Aufstellung geht deutlich das dauernde Fallen des Aetherextractes hervor.

Der Einwand, dass die so auffällig langwierige Aetherextraction ihre Ursache habe in einer individuellen Eigenthümlichkeit, in einem ganz besonders grossen Fettreichtum des Versuchsgegenstandes, wird dadurch beseitigt, dass ein zweiter Versuch mit den Muskeln eines anderen Hundes dasselbe Ergebniss hatte. Dieser Versuch wurde jedoch nur so lange fortgesetzt als er von grundsätzlicher Bedeutung war. Versuche, mit Ligroïn schneller zum Ziele zu kommen, hatten ein negatives Ergebniss.

Bei der Beurtheilung der Frage, weshalb der Aether nur so äusserst schwierig das Fett aus der trocknen Muskelsubstanz herausholen kann und zwar auch dann nur in begrenzter Menge, steht zunächst fest, dass es darauf ankommt, dem Aether immer neue Oberflächen darzubieten. Dies geschieht eben durch das Pulverisiren, indem so das Gewebe in seinem Zusammenhange und die einzelnen Zellen selbst zerstört werden. Der Umstand, dass schon vom Aether in Lösung gebrachtes Fett durch das Organpulver selbst zurückgehalten werden kann, wird auch dazu beitragen, die Erschöpfung an Fett zu erschweren. Die Thatsache ferner, dass es innerhalb weniger Stunden gelingt, etwa $\frac{3}{5}$ der gesamten extrahirbaren Menge des Fettes zu erhalten und der dann noch vorhandene Theil nur ganz allmählich gewonnen werden kann, weist darauf hin, dass es verschiedene Arten des Fettvorkommens in den Muskeln gibt. Man kann sich nämlich vorstellen, dass das leichter Extrahirbare denjenigen Theil des Fettes darstellt, der als Reservestoff in dem interstitiellen Bindegewebe vorhanden ist. Diejenige Menge dagegen, welche der Aetherextraction so hartnäckigen Widerstand entgegensetzt und vollständig erst nach gänzlicher Desorganisation des Gewebes gewonnen werden kann, demjenigen Theil entspricht, der sich in dem Muskelparenchym selbst vorfindet.

Es ergibt sich somit, dass man auf dem Wege der Extraction mit Aether keine quantitative Bestimmung des Fettes und der Fettsäuren ausführen kann. Die Bestimmung der Seifen würde auf diese Weise überhaupt nicht möglich sein. Um jene auszuführen, bleibt demnach nur die Möglichkeit, die Organe „aufzuschliessen“. Es gelingt dieses recht vortheilhaft durch Pepsin-Salz-

säure¹⁾). Bei Anwendung dieses weiterhin ausführlich mitgetheilten Verfahrens wurden in den obigen drei Muskeln noch die in der Aufstellung III angegebenen Fettmengen ermittelt.

III.

	Angewandte Substanz	Fett ²⁾	%	Daraus an Fettsäuren durch Verseifung
Musc. gluteus }	2,0015	0,0182	0,91	0,0160
	2,3461	0,0200	0,85	0,0170
Musc. quadriceps (rechts)	2,1107	0,0171	0,81	0,0150
Musc. quadriceps (links)	2,2477	0,0189	0,84	0,0152

Es ergibt sich demnach die bemerkenswerthe Thatsache, dass aus den obigen drei Monate lang mit Aether behandelten Muskeln vermittelt der peptischen Verdauung noch etwa 8,5% der Gesamtmenge der Fette, Seifen und Fettsäuren erhalten wurden. Ist aber in dem untersuchten Organpulver noch eine so bedeutende Menge von diesen Körpern enthalten, wie viel mehr wird dann den bisherigen Autoren bei der Bestimmung des Fettes mittelst der Extractionsmethode entgangen sein? Die bisherigen Fettbestimmungen in thierischen Organen sind deshalb weit davon entfernt, einen auch nur annäherungsweise richtigen Werth für die Menge der Fette und Fettsäuren zu ergeben.

Was nun den Aetherextract betrifft, so ist bekannt, dass ausser dem Fett und den höheren Fettsäuren noch eine Anzahl

1) Die vorliegende Untersuchung war abgeschlossen, als mir eine Arbeit von Radziejewski (Virch. Arch. 1868. 43. 268) über Fettresorption bekannt wurde. In derselben gibt er kurz an, dass er die künstliche Magenverdauung zur Bestimmung des Fettes im Fettgewebe und im Muskel verwandt habe, ohne dass er irgend eine Mittheilung darüber macht, weshalb man grundsätzlich dies Verfahren anwenden muss. Sein primitives Verfahren, das ganz in Vergessenheit gerathen zu sein scheint, hat er keineswegs ausgearbeitet. In der vorliegenden Form ist es für quantitative Zwecke nicht brauchbar.

2) Ich setze hier absichtlich für den Aetherextract die Fette und Fettsäuren ein. Der Beweis hierfür findet sich weiter unten; er ergibt sich weiter aus der Thatsache, dass man durch Verseifung die berechnete Menge an Fettsäuren erhielt.

anderer Substanzen in grösserer oder geringerer Menge in denselben bei der Behandlung von getrocknetem Fleisch mit siedendem Aether übergehen. Dabin gehören die Lecithine, das Cholesterin und seine Verbindungen und stickstoffhaltige Extractivstoffe.

Ich bemerke zunächst allgemein, dass die erhaltenen Aetherauszüge im Anfang dickflüssig waren in Folge des vorherrschend vorhandenen Oleïns. Nach mehrtägigem Stehen schieden sich aus denselben weisse, körnige Massen aus, die aus Stearin bestanden. Daneben waren freie Fettsäuren vorhanden. Nachdem das Fleischpulver etwa 500 Stunden extrahirt worden war, erhielt man Auszüge von festerer Beschaffenheit. Ich will nicht unterlassen zu bemerken, dass es immerhin längere Zeit dauerte bis die Aetherauszüge ein constantes Gewicht besaßen. Die hierbei ermittelte Gewichtsabnahme steigerte sich bei den nach einander erhaltenen Aetherausügen. Diese Flüchtigkeit einzelner Bestandtheile der Auszüge weist darauf hin, dass man es hier mit niederen Fettsäuren zu thun hat. Bei den in den drei Aufstellungen I angegebenen Werthen sind nur die aus dem constanten Gewicht ermittelten Zahlen berücksichtigt worden. Beim Verdunsten des Aethers der nach der 100 stdg. Extractionszeit erhaltenen Auszüge auf dem Wasserbade entwickelte sich ein unangenehmer, stechender, die Schleimhäute reizender Körper, der Acroleïn zu sein scheint.

Da nun die in den ersten Stunden der Extractionszeit erhaltenen Aetherauszüge schon mehrmals von anderen Seiten untersucht worden sind und es für meine Zwecke schliesslich nicht darauf ankam, wie viel Fett im Ganzen durch die Extraction erhalten worden war, so habe ich mich begnügt, einzelne mir besonders bemerkenswerthe Auszüge auf Fett, Fettsäuren und Cholesterin zu untersuchen. Es ist dadurch der Nachweis des Vorhandenseins von Fett, Fettsäuren und Cholesterin — siehe Aufstellung I — erbracht worden. Mit jedem einzelnen Auszuge¹⁾ wurden jedoch die qualitativen Reactionen auf Glycerin angestellt. Diese Reactionen hatten nur ausnahmsweise ein negatives Ergebniss. Dies trat bemerkenswerther Weise mehrmals dann ein, wenn die Muskelsubstanz vor der Extraction nicht aufs Neue pulverisirt worden war. In solchen Fällen enthielt der Auszug²⁾

1) Soweit sie nicht verseift wurden.

2) Argutinsky (l. c.) macht schon darauf aufmerksam, „dass der spärliche Rückstand der letzten Tage krystallinischer war“.

schon nach dem Verjagen des Aethers deutlich sichtbare, manchmal concentrisch angeordnete lange Nadeln. Die Verseifung ergab das Vorhandensein von Cholesterin und Fettsäuren. Es ist wahrscheinlich, dass das Cholesterin nicht nur als solches vorhanden gewesen sein wird, sondern zum Theil in der Form der von Hürtle¹⁾ im Blut nachgewiesenen Fettsäureester. Der Gesamtaetherauszug eines zweiten Theiles des *Musc. gluteus* des untersuchten Hundefleisches enthielt, nach der Methode von Obermüller²⁾ behandelt, 0,0277 g Cholesterin. Da 12 g trockner Muskelsubstanz angewandt worden waren, so enthielt dieselbe 0,23% Cholesterin.

Lecithin wurde nur qualitativ durch das Vorhandensein von Phosphor nachgewiesen.

Was den Stickstoffgehalt der Auszüge betrifft, so ergibt sich aus der Aufstellung IV, dass dieser sehr gering ist; mit den nach einander erhaltenen Auszügen nimmt derselbe zu.

IV.

a) *Musc. gluteus*.

Aetherextract	Angewandte Substanz	Stickstoff nach Kjeldahl	Stickstoff berechnet für 4,2949 g Aetherextract	% N	Mittel für den gesammten Aetherextract
1) Gewonnen durch 221 stdg. Behandeln des Muskelpulvers mit siedendem Aether.	0,2230	0,0006	0,0133	0,31	0,42%
	0,2605	0,0008	0,0137	0,32	
2) Nach weiterer 642 stdg. Behandlung.	0,0750	0,0008	Ber. f. 0,6591 g Aetherextract 0,0074	1,12	
	0,1217	0,0013	0,0073	1,13	

b. *Musc. quadriceps* (rechts).

1) Gewonnen durch 278 stdg. Behandeln des Muskelpulvers mit siedendem Aether.	0,1295	0,0003	Ber. f. 3,1681 g Aetherextract 0,0096	0,31	0,43%
	0,1050	0,0003	0,0104	0,33	
2) Nach weiterer 593 stdg. Behandlung.	0,0909	0,0009	Ber. f. 0,5440 g Aetherextract 0,0058	1,08	
	0,0960	0,0010	0,0059	1,09	

1) Z. f. physiol. Chem. 21. 331.

2) Dissertation Berlin 1892. pag. 57.

Es ergibt sich demnach im Mittel genau derselbe Werth, welchen Petersen¹⁾ im Aetherextract von magerem Rindfleisch ermittelt hat.

Werden Fette und Seifen durch die peptische Verdauung gespalten?

Es handelt sich nun zunächst um die Frage, ob das Fett bei der Einwirkung von künstlichem Magensaft eine Spaltung erleidet. Der durch eine Abspaltung des Glycerins bedingte Verlust ist allerdings so klein, dass man ihn wohl vernachlässigen könnte. Es ist jedoch zu bemerken, dass man dann nicht im Stande sein würde, das Verhältniss der Fette zu den Fettsäuren zu ermitteln. In der letzt erschienenen Arbeit über diese Frage kommt Conte-jean²⁾ im Gegensatz zu den Untersuchungen von Cash³⁾, Ogata⁴⁾ und Marpmann⁵⁾ zu dem Schluss, dass „der Magensaft keine verdauende Wirkung auf das Hammelfett ausübt“⁶⁾. Da es für meine Zwecke lediglich darauf ankommt, festzustellen, ob die künstliche Magenverdauung eine Veränderung der Fette bewirkt, so habe ich nur die diesbezüglichen Versuche von Conte-jean in Betracht zu ziehen. Er liess zur Ermittlung jener Frage „wochenlang“ bei einer Temperatur von 40° künstlichen Magensaft eines Hundes auf Hammelfett einwirken. Dasselbe „verlor kein Centigramm an Gewicht“. Da nun Conte-jean nichts darüber mittheilt, wie viel Substanz er in seinen Versuchen angewandt hat, so können jene Centigramm! ebensowohl auf einen grossen wie auf einen ganz geringen Verlust gedeutet werden. Aus diesem Grunde habe ich daher den Versuch der Einwirkung von Pepsin-Salzsäure auf Fett wiederholt, deren Ergebnisse die Aufstellung V enthält.

---

1) Zeitschr. f. Biologie 7, 175.

2) Arch. de Physiol. 1894. (V.) 6. 127.

3) Du Bois-Reymond's Arch. 1880. pag. 323.

4) Eod. l. 1881. pag. 515.

5) Münch. med. Wochenschr. 1888. pag. 485.

6) l. c. pag. 134.

V.

Angewandte Substanz.	Es werden hinzugefügt	Behandlung	Wiedergewonnene Substanz.	Nachd. Behandlung mit Na_2CO_3 erhaltenes Fett.
1) 0,7717	0,15 g Pepsin und 100 ccm 0,5% HCl	24 Stunden bei $37^\circ/38^\circ$	0,7710	0,7703
2) 1,2288	"	"	1,2281	1,2275
3) 0,6554	0,5 g Pepsin und 100 ccm 0,5% HCl	32 Stunden bei $37^\circ/38^\circ$	0,6542	0,6538
4) 0,8375	"	41 Stunden bei $37^\circ/38^\circ$	0,8370	0,8371

Durchaus von Fettsäuren freies Schweinefett wurde mit den in obiger Aufstellung angegebenen Mengen Pepsin(Merk)-Salzsäure¹⁾ mehrere Stunden bei einer Temperatur von $37-38^\circ$ gehalten. Hierbei wurde keine sichtbare Veränderung der verschiedenen Fettproben beobachtet. Durch Behandlung mit Aether wurde dem Gewichte nach die angewandte Menge Substanz wiedergewonnen. Es wurde nunmehr, um die gegebenenfalls vorhandenen Fettsäuren zu bestimmen, eine jede der vier Proben mit einer Lösung von Natriumcarbonat behandelt. Eine Entwicklung von CO_2 wurde hierbei nicht beobachtet. War nun schon somit das Nichtvorhandensein von Fettsäuren wahrscheinlich gemacht, so wurde dieses sicher dadurch festgestellt, dass aus der filtrirten klaren Natriumcarbonatlösung auf Zusatz von Schwefelsäure keine Ausscheidung erfolgte. Da nun ausserdem die Gesamtmenge des Fettes auch jetzt in allen vier Versuchen, abgesehen von minimalen, nicht ausschliessbaren Verlusten, wieder gewonnen wurde, so ist damit erwiesen, dass unter den für die Methode der Fettbestimmung in Betracht kommenden Versuchsbedingungen keine Spaltung der Fette eintritt.

Was nun die in den Organen vorhandenen Seifen anbetrifft, so werden diese, wie ich mich durch Versuche überzeugt habe, durch die 0,5% Salzsäure gespalten und demnach mit den schon primär vorhandenen Fettsäuren als solche bestimmt.

Die Cholesterinester, welche auch zu den Fetten zu zählen sind, werden wahrscheinlich nicht gespalten werden.

1) Das angewandte Pepsin war von guter verdauender Kraft.

Ausführung der Methode.

Die Organe werden zunächst entweder in vacuo oder bei einer Temperatur von 50°—60° getrocknet, alsdann nach Möglichkeit pulverisirt, gut gemischt und etwa 30 g derselben mit Aether im Soxhlet'schen Extractionsapparate 4—6 Stunden behandelt. Der hierbei gewonnene Aetherauszug wird, je nach den Anforderungen, die man an die Genauigkeit der Analyse stellt, entweder auf seinen Gehalt an Fetten, Fettsäuren u. s. w. untersucht oder gleich in Anrechnung gebracht. Während man bei manchen Organen auf jene Untersuchung verzichten könnte, darf man sie beim Gehirn und Rückenmark unbedingt nicht unterlassen. Es ist nothwendig die kurze Aetherextraction der getrockneten Organe der Behandlung derselben mit Pepsin-Salzsäure voraufgehen zu lassen, weil es so möglich ist, in grösseren Mengen Substanz eine Fettbestimmung vornehmen zu können. Somit erhält man auch zuverlässige Ergebnisse, die man nicht erwarten darf, wenn man z. B. im Fleisch den Fettgehalt ermitteln will, da dasselbe, wofern nicht das sichtbare Fett und Bindegewebe abpräparirt worden ist, keine homogene Mischung in Bezug auf Fettvertheilung darstellt. Eine solche Mischung kann man bei den Organen zuverlässig nur dann erreichen, nachdem dieselben die grössere Menge an Fett schon abgegeben haben; dies letzte eben erreicht man schon durch die kurze Extractionszeit. Wie schon früher erwähnt, lässt sich das Organ alsdann erst fein pulverisiren, zum mindesten so fein, dass man eine homogene Mischung, wie sich aus der Uebereinstimmung der weiter unten mitgetheilten Analysen ergibt, als vorhanden annehmen darf. Es ist auch weiterhin aus praktischen Gründen vortheilhaft, die Hauptmenge des Fettes durch Behandlung mit siedendem Aether zu gewinnen, da bei Anwendung der directen Verdauung einer Substanz die quantitative Gewinnung grösserer Fettmengen ihre Schwierigkeiten hat, die sich nur bei besonderer Vorsicht und Uebung überwinden lassen. Da ausserdem eine Trockengewichtsbestimmung der Organe gewöhnlich ohnehin gemacht werden muss, so bildet die kurze Extractionszeit keine Erschwerung der Methode.

Ich gehe nun zunächst auf die Gewinnung einer brauchbaren Verdauungsflüssigkeit ein, da von deren Wirksamkeit die Genauigkeit der Analyse naturgemäss abhängig ist.

Zum Zwecke der Aufschliessung der Organe habe ich theils die directen Auszüge der Schweinemägen mit 0,5% Chlorwasserstoffsäure verwandt, theils Pepsinpräparate benutzt. Was die ersten anlangt, so wurde der frisch einem Schweine entnommene Magen mit Wasser gereinigt. Alsdann wurde die Magenschleimhaut entweder abpräparirt und dann in kleine Stückchen geschnitten oder die oberen Schichten derselben mit einem stumpfen Messer abgekratzt und die so gewonnene Masse zusammen mit etwa 600 ccm 0,5% Chlorwasserstoffsäure 1–4 Stunden einer Temperatur von 37°/38° ausgesetzt. Die etwas schleimige Flüssigkeit wurde alsdann collirt und weiter noch filtrirt. Die auf dem Collirtuche bleibende Masse kann dann noch einmal zur Herstellung einer brauchbaren Verdauungsflüssigkeit verwandt werden. Die auf diese Weise erhaltene Verdauungsflüssigkeit war von durchgehends ausgezeichneter peptischer Wirkungsfähigkeit und zwar reichten je 100 ccm derselben hin, um die zur Analyse nöthige Menge getrockneten Organes gut und schnell aufzulösen. Da die Verdauungsflüssigkeit nun selbst nicht frei von Fett ist, so muss in ihr in derselben Weise, wie weiter unten für das Organ selbst angegeben ist, dasselbe bestimmt werden. Ich erhielt hierbei aus mehreren Analysen ein und desselben Magenauzuges Werthe, die von einander nur um 0,0010–0,0015 g verschieden waren. Der Auszug bestand aus Fett. Bei Anwendung eines Auzuges aus Hundemägen wurde eine grössere verdauende Kraft dieses gegenüber denen vom Schweine ermittelt. Da man jedoch gewöhnlich solche Auszüge nicht zur Verfügung hat, so erscheint mir die Benutzung der Auszüge des Schweinemagens am wohlfeilsten und recht zweckentsprechend. Es ist nun nicht von der Hand zu weisen, dass die jedesmalige Herstellung der Auszüge der Magenschleimhaut und die Bestimmung des primär in ihnen vorhandenen Fettes umständlich ist. Eine bedeutende Zeitersparniss gewinnt man bei der Benutzung von Pepsinpräparaten. Es wurden dieselben angewandt in 0,1% Lösung¹⁾ in 0,5% Chlorwasserstoffsäure. Allerdings muss ich bemerken, dass manche Pepsinpräparate des Handels viel zu wünschen übrig lassen, sodass man ein Präparat auf seine verdauende Kraft jedesmal untersuchen muss. Diese Prüfung muss von Zeit zu Zeit mit demselben

---

1) Conf. K l u g, P f l ü g. Arch. 60. 43.

Präparate wiederholt werden. Hat man ein gut verdauendes Pepsinpräparat zur Verfügung, so ist die Benutzung desselben allem anderen schon aus dem Grunde vorzuziehen, weil die Bestimmung des primären Fettes nur 1 bis 2 Mal ausgeführt zu werden braucht und, wenn solches überhaupt vorhanden ist, durch die gewöhnlich ganz minimale Menge desselben die Methode an Schärfe gewinnt.

Ich kehre nunmehr zur Methode selbst zurück. Da es in Folge nicht hinreichenden Trocknens der Organe vorkommen kann, dass die Differenz im Gewicht zwischen der ursprünglich ermittelten Trockensubstanz und der nunmehr extrahirten grösser ist als das Gewicht des Aetherauszeuges, so muss das Gewicht des extrahirten Organpulvers in solch einem Falle auf's Neue ermittelt werden, um einen aliquoten Theil desselben zur Verdauung benutzen zu können. Zur Erzielung einer möglichst gleichmässigen Mischung und zur Unterstützung der Verdauungsflüssigkeit pulverisirt man nunmehr noch das extrahierte Pulver, fügt zu 2—4 g desselben 100 ccm der oben angegebenen Verdauungsflüssigkeit und setzt das Ganze einer Temperatur von $37^{\circ}/38^{\circ}$ aus. Bei Anwendung eines guten Magenschleimhautauszuges ist das Pulver oft schon in $\frac{3}{4}$ —2 Stunden verdaunt und kann weiter verarbeitet werden. Bei Anwendung eines Pepsinpräparates muss man die Einwirkungszeit gewöhnlich bedeutend verlängern, auf zehn, selbst bis auf 24 Stunden. Bei einiger Uebung kann man sich ohne Mühe ein Urtheil über den Grad der Verdauung bilden; durch einen etwaig vorhandenen voluminösen, feinen, schleimigen Niederschlag, der sich oft in Folge der Verdauung bildet, darf man sich hierbei nicht täuschen lassen. Durch erneuten Zusatz von 0,5% Salzsäure kann man manchmal eine gestörte Verdauung befördern. Die erhaltene Flüssigkeit kann nun nicht unmittelbar mit Aether ausgeschüttelt werden, sie muss zunächst zur Entfernung des nicht Verdauten — ein geringer Theil wird, wie bekannt, überhaupt nicht verdaunt — filtrirt werden. Es gelingt dies recht vortheilhaft mittelst eines Faltenfilters, auf dessen Boden man einen kleinen Bausch von Glaswolle legt. Um die Filtration zu beschleunigen, ist es zweckmässig, die Flüssigkeit von dem nicht Verdauten abzugiessen und mit warmem Wasser verdünnt zu filtriren. Der eine Theil des Fettes findet sich nunmehr mit dem Rückstande auf dem Filter, der andere in der filtrirten Flüssigkeit. Um den

einen Antheil zu gewinnen, wird das Filter sammt dem Rückstande entweder im Exsiccator oder bei $35^{\circ}/45^{\circ}$ getrocknet und dann mittelst heissen Aethers im Soxhlet'schen Extractionsapparate erschöpft. Dies kann verschieden lange Zeit, 15–40 Stunden, in Anspruch nehmen. War das Organpulver nicht gut verdaut und zwar vornehmlich das Bindegewebe zurückgeblieben, so muss man sich durch einen erneuten Verdauungsversuch überzeugen, ob der Filtrerrückstand nach der Aetherextraction noch Fett ergibt. Was die Gewinnung des Fettes aus dem obigen Filtrate betrifft, so gelingt dies durch Ausschütteln mit Aether. Es genügt zu diesem Zwecke je 100–150 ccm Aether zu verwenden und das Ausschütteln 4 bis 6 mal zu wiederholen; natürlich so lange, bis der Aether nichts mehr aufnimmt. Die Genauigkeit und Schnelligkeit des Ausschüttelns hängt wesentlich davon ab, dass es gelingt, die aetherische und wässrige Schicht scharf zu trennen. Es gelingt nun durchaus, dies soweit zu erreichen, dass man eine quantitative Bestimmung des Fettes in der Flüssigkeit darauf gründen kann. Bei unvorsichtigem Arbeiten kommt es vor, dass die Grenzschicht von Aether und Wasser durch emulsionsartige Bildungen nicht zu ermitteln ist. Dies lässt sich sicher dadurch vermeiden, dass man zunächst eine kleinere Menge Aether, als oben angegeben ist, zu der auszuschüttelnden Flüssigkeit hinzufügt und einige Male langsam und vorsichtig schüttelt. Zeigt sich auch nur schwache Neigung zur Emulsionsbildung, so unterbricht man unmittelbar das Schütteln, fügt vorsichtig erneut Aether hinzu und lässt nunmehr stehen bis die Schichten sich wieder scharf getrennt haben. Man schüttelt alsdann vorsichtig von Neuem und hat nunmehr gewöhnlich schon erreicht, dass, indem man stufenweise stärker schüttelt, keine Bildung von „Schmierem“ mehr auftritt. Treten jedoch nach einmal erneutem Aetherzusatz beim Schütteln wiederum emulsionsartige Bildungen auf, so unterbricht man sofort das Schütteln und verfährt, wie vorher angegeben worden ist. Auf diese Weise gelingt es nun durchaus, die Ausschüttelung quantitativ auszuführen. Die jedesmalig erhaltene aetherische Schicht, die beim ersten Male immer rosa gefärbt ist, lässt man zunächst durch ein, auch zwei Faltenfilter gehen, um das beigemengte Wasser zu entfernen. Ein Theil des dann noch vorhandenen Wassers setzt sich schnell in Tröpfchen ab, wenn man die aetherischen Auszüge mehrere Minuten in einem Becherglase stehen

lässt. Der nach dem Verjagen des Aethers der gesammten Aetherauszüge erhaltene Rückstand schliesst nun noch anorganische Bestandtheile ein. Man entfernt zunächst immer noch vorhandenes Wasser und nimmt alsdann den Rückstand mit Aether auf und verjagt den letzteren. Dieses Verfahren muss gegebenenfalls noch einmal wiederholt werden.

Der so gewonnene Rückstand, vereinigt mit der Menge, die durch Extrahiren des Filters erhalten worden ist, stellt demgemäss die noch durch Verdauung gewonnene Fettmenge des Organpulvers dar. Der Rückstand wird nunmehr endgültig entweder bei 40° oder im Exsiccator getrocknet. Soweit es die Muskelsubstanz betrifft, habe ich von anderen Substanzen in jenem Rückstande nur geringe Mengen eines braunrothen Farbstoffes gefunden. Nach der Verseifung ergaben sich für die Fettsäuren fast die theoretischen Werthe, wenn man der Berechnung Oleo-Stearo-Palmitin als vorhanden zu Grunde legt. Eine Untersuchung über die Natur der so erhaltenen Fette scheitert an der geringen Menge derselben.

Zum Beweis für die Zuverlässigkeit der beschriebenen quantitativen Methode gebe ich in der Aufstellung VI einige Analysen von Muskeln dreier Hunde. Die Analysen unter A wurden unter Anwendung des Auszuges der Magenschleimhaut eines Schweines, diejenigen unter B bei Benutzung eines Pepsinpräparates ausgeführt. Um die Uebersichtlichkeit der Aufstellung VI nicht zu beeinträchtigen, ist bei den Angaben der durch Verdauung erhaltenen Fettmenge das primär in der Verdauungsflüssigkeit enthaltene Fett — 1) 0,0050 g, 2) 0,0080 g — schon abgezogen worden. Dies ist jedoch nur der Fall soweit es A betrifft. Bei den diesbezüglichen Angaben für B war kein solcher Abzug zu machen, da die benutzte Menge von 0,100 g Pepsin nur 0,001 g Extract enthielt.

Die Uebereinstimmung der Ergebnisse obiger Analysen unter einander verbürgt die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Methode. Ihre Genauigkeit reicht so weit, dass sie den Anforderungen, die man an die quantitative Bestimmung eines Körpers stellen darf, Genüge leistet.

Die Anwendung der Methode ergibt demnach die Gesamtmenge der in dem untersuchten Organe enthaltenen Fette, Seifen und Fettsäuren.

VI.

A.

Durch Aetherextraction erhalten:			Durch Verdauung erhalten:					Im Ganzen demnach erhalten:			
Angewandte Substanz	Fett berechnet aus den Fettsäuren	%	Ange wandte Substanz	Fett	%	Durch Versäufung erhaltene Fettsäuren	%	Be-rech-net	Fett	%	Mittel
1) 30 g in vacuo getrockneter Hundemuskel; 12 St. mit Aether extrahirt.	2,0135	6,70	1) 1,6701	0,0153	0,92	0,0140	0,84	0,88	2,2895	7,60	7,65 %
			2) 1,9578	0,0194	0,99	0,0178	0,91	0,96	2,3105	7,70	
2) 35 g in vacuo getrockneter Hundemuskel; 12 St. mit Aether extrahirt.	2,7501	7,86	1) 1,6735	0,0212	1,26	0,0201	1,20	1,22	3,2911	9,12	9,09 %
			2) 1,8287	0,0218	1,19	0,0190	1,04	1,15	3,1666	9,05	

B.

Durch Aetherextraction erhalten:			Durch Verdauung erhalten:						Im Ganzen demnach erhalten:		
Angewandte Substanz	Fett berechnet aus den Fettsäuren	%	Ange wandte Substanz	Fett	%	Durch Versäufung erhaltene Fettsäuren	%	Be-rech-net	Fettmenge berechnet aus den Fettsäuren	Fett	% Mittel
30 g in vacuo getrockneter Hundemuskel; 5 St. mit Aether extrahirt.	1,9563	6,50	2,7557	0,0770	2,80	0,0640	2,32	2,69	0,0669	2,43	8,95
			3,0678	0,0861	2,81	0,0762	2,48	2,71	0,0807	2,63	9,15
			3,1970	0,0897	2,80	0,0773	2,42	2,71	0,0809	2,53	9,05

Die Ergebnisse vorstehender Untersuchung fasse ich dahin zusammen.

1. Selbst durch monatelange, tägliche Behandlung der getrockneten und nach grösster Möglichkeit immer aufs Neue pulverisirten Muskelsubstanz mit siedendem Aether gelingt es nicht, dieselbe an Aetherextract zu erschöpfen.

2. In den ersten Stunden des Extrahirens gewinnt man den grösseren Theil des Aetherextractes. Der Rest lässt sich nur äusserst schwierig und auch nur theilweise aus dem Gewebe herausholen.

3. Der nach monatelangem Extrahiren erhaltene Auszug (Hundemuskel) besteht aus den Glyceriden der Oelsäure, der Stearinsäure und diesen Säuren selbst. Er enthält ausserdem Cholesterin und niedrige, flüchtige Fettsäuren. Lecithin und stickstoffhaltige Extractivstoffe sind nur in geringer Menge vorhanden.

4. Durch die künstliche, peptische Verdauung gelingt es festzustellen, dass in dem monatelang extrahirten Muskel noch etwa 8,5 % der Gesamtmenge der Fette, Seifen und Fettsäuren enthalten sind.

5. Die Glyceride der Fette werden bei der künstlichen, peptischen Verdauung unter den in Betracht kommenden Bedingungen nicht gespalten. Die Seifen werden dagegen zerlegt.

6. Die bisherige Methode zur Bestimmung des Fettes in thierischen Organen mittelst siedenden Aethers ist ganz unbrauchbar, da sie zu niedrige Werthe ergibt.

7. An ihre Stelle tritt die oben beschriebene Methode, welche die Behandlung der Organe mit siedendem Aether mit der nachherigen Anwendung der künstlichen, peptischen Verdauung verbindet.

8. Die Controllanalysen beweisen die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der neuen Methode. Dieselbe ergibt die Gesamtmenge der in den Organen enthaltenen Fette (Cholesterin), Seifen und Fettsäuren.

Ich verfehle nicht, auch an diesem Orte Herrn Prof. Dr. E. Pflügler, der mich zur Bearbeitung dieses Themas aufgefordert hat, meinen Dank für seine Anregung und gewährte Unterstützung auszusprechen.