614 Stutzer u. von Wolosewicz: Untersuchungen über die Ermittlung des in
Untersuchungen über die Ermittlung des in der Rübenmelasse
in Form von Eiweiss enthaltenen Stickstoffs.

Von

A. Stutzer (Ref.) und J. E. von Wolosewicz.

Der Gehalt der Rübenmelasse an Eiweiss ist ein geringer im Vergleich zu der grossen Menge von solchen Stickstoff-Verbindungen, welche für die Ernährung wertlos sind. Daher hat es ein Interesse, eine brauchbare Methode zu besitzen, welche die Bestimmung des Eiweissstoffs, beziehungsweise des Stickstoffs der Eiweissstoffe gestattet. Von O. Kellner¹⁾ wurde für die Melasse das bei der Untersuchung anderer Futtermittel in Anwendung kommende Kupferoxydhydrat mit der Begründung verworfen, dass diese Kupferverbindung auch einen Teil der Amidosäuren fälle. Dagegen soll Tannin in schwach saurer Lösung die Eiweissstoffe vollkommen ausfällen, während hierdurch die Amide und die Amidosäuren nicht unlöslich werden.

Wir wollen zunächst darauf hinweisen, dass Tannin als Fällungsmittel für Eiweiss, allgemein betrachtet (also nicht nur in der speziellen Anwendung bei der Untersuchung von Melasse) wiederholt in Anwendung gekommen ist.

Schon vor längerer Zeit ist von Almen in Upsala der Vorschlag gemacht worden, die Eiweissstoffe mit einer mit Essigsäure versetzten Tanninlösung zu titrieren. Girgensohn bemängelte das Verfahren und gab statt dessen eine andere, nicht auf Titrierung beruhende Methode an.²⁾ Nach anderen Angaben werden Eiweiss, Pepton und Albumose durch Gerbsäure gefällt, jedoch sollen in einem Überschuss des Fällungsmittels die ausgeschiedenen Peptonverbindungen wieder gelöst werden.³⁾

Die Anwendung einer Lösung von Tannin und Essigsäure wird ferner von Liebermann erwähnt.⁴⁾ R. Wagner erhielt keine brauchbaren Resultate.⁵⁾ J. Sebelien verwendete Tannin zur Fällung der Proteinstoffe der Milch mit gleich gutem Erfolge wie Kupferoxydhydrat.⁶⁾ Gute Ergebnisse mit Tannin und Essigsäure erhielt

1) Landwirtschaftliche Versuchs-Stationen **54**, 37 u. 114.

2) Girgensohn, Diss., Dorpat 1872 und Jahresber. d. Tierchemie **2**, 14.

3) Zeitschrift f. Biologie **20**, 324; Jahresber. d. Tierchemie **20**, 26.

4) Ber. der deutsch. chem. Ges. zu Berlin **8**, 1046.

5) Landwirtschaftliche Versuchs-Stationen **21**, 260.

6) Zeitschrift f. physiol. Chemie **13**, 135; Jahresber. f. Tierchemie **18**, 99.

Schjerning. Dieser bemerkt jedoch, dass manche Alkaloide und gewisse andere stickstoffhaltige Verbindungen durch Tannin ebenfalls gefällt werden und somit das Verfahren einen nur zweifelhaften Wert besitze. Albumosen und Peptone werden nach Schjerning nur teilweise oder gar nicht durch Tannin gefällt.¹⁾ C. T. van Nuys und R. E. Lyons fällen Eiweiss ebenfalls mit Gerbsäure und bestimmen im Niederschlage den Gehalt an Stickstoff.²⁾

Ich stelle die Frage: Welche stickstoffhaltigen Bestandteile kommen in der Melasse vor? Wir haben darin von organischen Verbindungen: Abkömmlinge und Zersetzungsprodukte des Eiweisses, des Asparagins und Glutamins, Betaïn und eine Reihe anderer Verbindungen.³⁾

Die Eiweissstoffe werden, wenn auch vielleicht nicht vollständig, so doch zum grossen Teil nicht als solche, sondern als Pepton in der Melasse enthalten sein. F. Stohmann sagt⁴⁾: »Im Laufe der Fabrikation werden die Eiweissstoffe zunächst zu Peptonen umgesetzt. Diese Körper sind schon früher von E. Schulze in Futterrüben und in neuester Zeit von A. Rümpler in stark gekeimten Rübenköpfen nachgewiesen worden. Von Eiweissstoffen unterscheiden sie sich dadurch, dass sie leicht durch Membranen diffundieren, was Eiweiss nicht tut.« Es ist sehr wahrscheinlich, dass beim Extrahieren der Rübenschnitzel nach dem Diffusionsverfahren, sowie bei der Behandlung der Rübensäfte mit Kalk und bei dem wiederholten Einkochen die Eiweissstoffe zum grossen Teil in Peptone verwandelt werden. Es sei in dieser Hinsicht auf ältere Beobachtungen hingewiesen, die mit den neueren Anschauungen nicht im Widerspruch stehen. Mulder, Meissner⁵⁾, Thiny⁶⁾ erwähnen, dass Eiweissstoffe durch andauerndes Kochen in Peptone übergeführt werden können. Kern nimmt an, dass die von ihm gefundenen, ziemlich beträchtlichen Mengen von Peptonen in den Extrakten verschiedener Heusorten erst bei der Extraktion sich gebildet haben und zwar entweder unter der Einwirkung eiweisslösender Fermente, oder es kann das mehrstündige Erhitzen mit Wasser peptonisierend auf Eiweiss eingewirkt haben.⁷⁾

1) Diese Zeitschrift 39, 549; siehe auch 28, 383 (Sebelien).

2) Chem. Zentralblatt 1890, II, S. 211.

3) Stohmann, Handbuch d. Zuckerfabrikation 4. Aufl., S. 577.

4) Stohmann, Handbuch der Zuckerfabrikation S. 62.

5) Gmelins Handbuch der Chemie VII, 2202.

6) Zeitschrift f. rationelle Medizin von Henle und Pfeifer 14, 78.

7) Zitat aus E. Schulze, landwirtschaftliche Versuchs-Stationen 26, 234.

Wir werden jedenfalls damit rechnen müssen, dass die Melasse Peptone enthält. Der direkte Nachweis durch die Biuretreaktion ist in den stark gefärbten Melassen schwer zu erbringen.

Unter den in der Melasse vorhandenen Abkömmlingen des Asparagins und des Glutamins interessiert vorzugsweise die Asparaginsäure und die Glutaminsäure, weil diese Amidosäuren mit Kupfer schwer lösliche Verbindungen bilden, und diese Tatsache war gerade der Anlass, weshalb O. Kellner den Gebrauch von Kupferoxydhydrat bei der Untersuchung von Melasse bemängelt. Asparaginsaures Kupfer ist in 2870 Teilen und glutaminsaures Kupfer in 3400 Teilen kalten Wassers löslich.

Wird nun aber die Löslichkeit dieser Kupferverbindungen in einer Flüssigkeit, die Melasse enthält, die gleiche sein? Sehr wahrscheinlich sind die betreffenden Kupferverbindungen bei Vorhandensein von Melasse leichter löslich. Nach den Beobachtungen von F. Hoffmeister¹⁾ und nach denjenigen von E. Schulze²⁾ scheiden die Kupfersalze der Amidosäuren sich nicht aus, wenn solche mit eingedunsteten, vegetabilischen Stoffen gemengt sind.

Nach F. Hoffmeister wird die Ausscheidung der schwer löslichen Kupfersalze durch beigemengte fremde Substanzen und namentlich durch gleichzeitig vorhandene leichter lösliche Kupfersalze gehindert.³⁾ Nach dem von E. Schulze gegebenen Beispiel⁴⁾ scheiden asparaginsaures und glutaminsaures Kupfer aus reinen Lösungen sich schnell aus, während dies meist nur sehr langsam geschieht, wenn Mischungen beider Kupfersalze vorhanden sind. Aus weiteren Versuchen ging hervor, dass aus einer mit anderen Amidosäuren verunreinigten Leuzinlösung nach dem Sättigen mit Kupferoxydhydrat die Abscheidung des Leuzinkupfers erst längere Zeit nach dem Erkalten, in manchen Fällen erst nach dem Eindunsten auf ein geringes Volumen erfolgte. E. Schulze schliesst hieraus, dass sich die Kupfersalze der Amidosäuren gegenseitig in Lösung halten. Aus allen diesen Tatsachen scheint hervorzugehen, dass die Anwendung des zur Trennung der Eiweissstoffe vom Nichteiweiss allgemein gebrauchten Kupferoxydhydrats bei der Untersuchung von Melasse nicht ohne weiteres zu verwerfen ist und eine nähere Prüfung wünschenswert erscheint.

1) „Zur Kenntnis der Amidosäuren“, Ann. d. Chemie u. Pharm. **189**, 6.

2) Landwirtschaftliche Versuchs-Stationen **26**, 214.

3) Ann. d. Chem. u. Pharm. **189**, 25.

4) Landwirtschaftliche Versuchs-Stationen **26**, 220.

Wollen wir die Eiweissstoffe aus der Melasse durch Kupferoxydhydrat fällen, so müssen grössere Mengen dieses Reagenses angewendet werden, weil ein wesentlicher Teil des Kupfers durch die genannten organischen Säuren in Beschlag genommen wird und nun entsprechend weniger davon zur Verbindung mit Eiweiss und dergleichen zur Verfügung bleibt. Demgemäss schlug bereits D. N. Prijanischnikow vor¹⁾, in Fällen, in welchen reichliche Mengen von Amidosäuren in der zu untersuchenden Substanz vorhanden sind, die doppelte Quantität des von A. Stutzer empfohlenen Kupferoxydhydrats zu nehmen. Hierzu bemerke ich, dass die Ausarbeitung meiner Methode zu einer Zeit geschah, in welcher das »Verfahren Kjeldahl« noch nicht bekannt war, der Stickstoff musste nach »Will-Varrentrapp« bestimmt werden, und durfte man nach diesem Verfahren nicht wesentlich mehr als 0,5 g Kupferoxydhydrat auf je 1 g vegetabilischer Substanz verwenden. Bei der »Kjeldahl-Methode« liegen solche Beschränkungen nicht vor, und wir pflegen schon seit längerer Zeit so viel von dem aufgeschlämmten Kupferoxydhydrat zu verwenden, als 0,7—0,8 g Kupferoxydhydrat entspricht. Bei der Untersuchung von Melasse wird annähernd 1,0 g Kupferoxydhydrat genommen.

Ich veranlasste Wolosewicz, vergleichende Untersuchungen über die Ausscheidung von Stickstoff-Verbindungen aus der Melasse, einerseits durch Kupferoxydhydrat und andererseits durch Tannin, vorzunehmen, und teile über die von ihm erzielten Resultate folgendes kurz mit²⁾:

50 g Melasse wurden in ungefähr 300 cc destillierten Wassers gelöst, die Flüssigkeit filtriert und das Filtrat zu 500 cc verdünnt. Hiervon dienten für die einzelne Bestimmung je 100 cc, entsprechend 10 g Melasse.

- a) Methode mit Zugabe von Kupferoxydhydrat. Die alkalisch reagierende Melasselösung wird durch 2,5 cc einer gesättigten Alaunlösung schwach sauer gemacht, mit ungefähr 25 cc von aufgeschlämmtem Kupferoxydhydrat und 100 cc destillierten Wassers versetzt, umgerührt, und nach Verlauf von 5 bis 6 Stunden wird das Unlösliche abfiltriert. Vier gut unter einander übereinstimmende Bestimmungen ergaben einen Gehalt von 0,1518% N.

¹⁾ Landwirtschaftliche Versuchs-Stationen 52, 142.

²⁾ Die quantitative Bestimmung der Eiweissstoffe, von Wolosewicz. Dissertation, Königsberg 1905.

- b) Methode mit Tannin. Die Melasselösung wurde mit stark verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert, mit 200 cc einer 10-prozentigen Tanninlösung versetzt, umgerührt, die Flüssigkeit auf 500 cc verdünnt und nach Verlauf von 12 Stunden das Unlösliche gesammelt und zur Stickstoff-Bestimmung benutzt. Das Verfahren weicht von demjenigen Kellner's nur dadurch ab, dass der Stickstoff nicht in dem Filtrate, sondern in dem Rückstande ermittelt wird.¹⁾

Vier gut unter einander übereinstimmende Analysen ergaben einen Gehalt von 0,0205 % N. Auf Eiweiss, durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25 umgerechnet, würde also nach der einen Methode 0,95 % und nach der zweiten 0,12 % gefunden sein. Mit Kupfer erhält man höhere Zahlen. Ist diese höhere Zahl dadurch bedingt, dass ein Teil der Amidosäuren mit gefällt wurden, oder kann sie dadurch veranlasst sein, dass ein Teil des Peptons durch Kupfer gefällt wurde, während das Pepton bei Gegenwart von Tannin, wenn letzteres im Überschuss angewendet wird, löslich bleibt?

Wir teilen einige Versuche mit, die zur Beantwortung der Frage dienen können. Zu einer Melasselösung sind 0,25 g Asparaginsäure hinzugegeben. Nach der Tanninmethode untersucht, wurde bei Abwesenheit und bei Anwesenheit der Asparaginsäure der gleiche Stickstoffgehalt gefunden. Tannin macht demnach die Asparaginsäure nicht unlöslich. Bei einem anderen Versuche wurden Verhältnisse gewählt, die für die Lösung des asparaginsäuren Kupfers in so fern ungünstig waren, als nicht 10 g von der Melasse, sondern nur 3 g zur Untersuchung genommen wurden. Diese Lösung ist mit 0,25 g Asparaginsäure, entsprechend 0,0263 g Stickstoff versetzt. Durch verdünnte Schwefelsäure ist die Flüssigkeit schwach sauer gemacht und dann mit reichlichen Mengen von Kupferoxydhydrat vermischt. Nach 12-stündigem Stehen in der Kälte wurde das Unlösliche auf ein Filter gebracht, nachdem die Flüssigkeit zuvor erhitzt war, dann ist der Inhalt des Filters mit warmen Wasser ausgewaschen und der Stickstoff darin ermittelt worden.

Bei einem Parallelversuch war keine Asparaginsäure hinzugegeben. Der Mehrgehalt an Stickstoff bei dem Versuch mit Asparaginsäure in Gegenwart von Kupferoxydhydrat war 0,001355 g N, es sind demnach

¹⁾ Landwirtschaftliche Versuchs-Stationen 54, 114 u. 37.

95 % der zugesetzten Asparaginsäure in Lösung gebracht. Wahrscheinlich würde das Verhältnis ein noch günstigeres gewesen sein, wenn nicht 3 g sondern 10 g der Melasse zur Untersuchung verwendet worden wären, die Asparaginsäure somit mit grösseren Mengen von organischen Substanzen, namentlich mit grösseren Mengen von anderen Amidosäuren in Berührung gekommen wäre.

Die vorhin erwähnten Annahmen von E. Schulze und Hoffmeister dürften zutreffend sein, und die in der Melasse enthaltenen Amidosäuren einen nennenswerten störenden Einfluss bei der Anwendung von Kupferoxydhydrat auf die Ausfällung der in der Melasse enthaltenen Eiweissstoffe nicht ausüben. Der vorhin angegebene höhere Befund an Eiweiss beim Gebrauche von Kupferoxydhydrat im Vergleich zu der Wirkung des Tannins ist vermutlich durch die Anwesenheit von Peptonen bedingt, aber nicht durch Amidosäuren.

Bei der Untersuchung von Melasse auf den Eiweissgehalt verfolgt man den Zweck, das für die Ernährung wertvolle Eiweiss von den hierfür wertlosen Amidoverbindungen zu trennen. Das in der Melasse enthaltene Pepton ist kein wertloses Produkt, sondern es ist dem Eiweiss an die Seite zu stellen, und es würde am richtigsten sein, wenn man durch eine einfache Methode Eiweiss und Pepton gemeinsam bestimmen könnte. Eine derartige Methode kennen wir nicht, und glaube ich bei der Wertschätzung der stickstoffhaltigen Bestandteile der Melasse vorläufig einem solchen Verfahren den Vorzug geben zu sollen, durch welches dieses Ziel annähernd am besten zu erreichen ist. Dies geschieht durch den Gebrauch von Kupferoxydhydrat.

Vorhin wies ich darauf hin, dass die durch Tannin etwa fällbaren Peptone durch einen Überschuss des Fällungsmittels wieder in Lösung gebracht werden, und es kann daher nicht auffällig erscheinen, dass die Tanninfällung bei der Untersuchung von Melasse niedrigere Zahlen für den Stickstoffgehalt gibt, wie die Fällung mit Kupferoxydhydrat.

Demgemäss wird man bei der Untersuchung von peptonhaltigen Stoffen mit Kupferoxydhydrat für die unlöslichen Stickstoff-Verbindungen vermutlich stets höhere Zahlen finden, wie nach der Fällung mit Tannin. Wolosewicz führte vergleichende Untersuchungen mit gekeimten, nur wenig Pepton enthaltenden Kartoffeln und ausserdem mit Fibrinpepton von E. Merck-Darmstadt bezogen) aus. Die gekeimten Kartoffeln wurden getrocknet und gemahlen. Es waren darin vorhanden:

		In Prozenten des Gesamtstickstoffs:
Stickstoff, gesamte Menge	1,16 ‰	
« fällbar durch Kupferoxydhydrat	0,90 ‰	77,5
« « « Tannin.	0,74 ‰	63,8

Merck's Fibrinpepton.

Stickstoff, durch Kupferoxydhydrat fällbar	8,36 ‰	
« « Tannin fällbar	4,84 ‰	

Diese Zahlen scheinen auch dafür zu sprechen, dass der Mehrbefund an Stickstoff, welcher durch Fällung der Melasselösung mit Kupferoxydhydrat im Vergleich zu der Fällung mit Tannin erhalten wurde, sich wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Pepton zurückführen lässt.

Nach meiner Ansicht kann bei der Wertschätzung der Melasse die Trennung der Proteinstoffe vom Nichtprotein mit Hilfe von Kupferpräparaten in der allgemein üblichen Weise vorgenommen werden, und es liegt kein Anlass vor, speziell bei der Untersuchung von Melasse ausnahmsweise das Tannin als Trennungsmittel zu verwenden.

Die anzustrebende Verbesserung muss darin bestehen, eine leicht ausführbare Methode aufzufinden, durch welche, gleichzeitig mit dem Eiweiss, die aus diesem durch das längere Kochen der Rübensäfte hervorgehenden peptonartigen Verbindungen (die wesentlich aus Albumose bestehen dürften) bestimmt werden.

Zum Nachweis von Saccharose und Milchzucker.

Von

A. Gawalowski.

Im Jahre 1899 habe ich in dieser Zeitschrift 38, 20 einen längeren Artikel über die »technisch und pharmazeutisch wichtigsten Versüssungsmittel« publiziert und dort meine modifizierte Baudouin'sche Methode zum Nachweis einiger Zuckerarten mittels Salzsäure und Sesamöl beschrieben, wie auf Seite 21 e zu finden. Nun hat Henry Leffmann 1906 in der Chemiker-Zeitung 638, in der Apotheker-Zeitung No. 52, und in der Zeitschrift des allgem. österr. Apotheker-Vereines No. 29, Seite 386 diese Methode speziell für die Unterscheidung von Saccharose und Milchzucker als etwas ganz neues beschrieben, ohne meiner um 7 Jahre älteren Mitteilungen zu erwähnen, während ich doch ausser auf Seite 21 e, auch noch Seite 24 e und 26—27 e schon damals genau das Verhalten von Saccharose- und Milchzucker-(Laktose) gegenüber dem Doppelreagens Salzsäure-Sesamöl angab.

Raitz bei Brünn, im Juli 1906.