Glikin, Wladimir Wolf
Berlin 1903

Untersuchungen

zur

Methode der Fettbestimmung

in thierischem Material.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

von der philosophischen Facultät

der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

genehmigt

und

nebst den beigefügten Thesen

öffentlich zu vertheidigen

am 19. März 1903

von

Wladimir Wolf Glikin

aus Russland.

Opponenten:

1. Herr **Peter Ladinsky,** cand. phil.,
2. Herr **Hermann Perlmann,** cand. techn.,
3. Herr **Bernhard Schapire,** cand. phil.

1903.

Pierer'sche Hofbuchdruckerei Stephan Geibel & Co. in Altenburg.

Meinen theuren Eltern.

(Aus dem thierphysiol. Laboratorium der landw. Hochschule zu Berlin.)

Untersuchungen zur Methode der Fettbestimmung in thierischem Material.

Von

W. Glikin, cand. phil.

Inhalt:

	Seite
1. Zur Geschichte und Kritik	1
2. Experimenteller Theil	11
A. Prüfung der üblichen Methoden	11
B. Eine neue Methode der Fettbestimmung	33

I. Zur Geschichte und Kritik.

Wer sich mit Fettbestimmungen beschäftigt hat, dem werden alle Schwierigkeiten, die in den Weg treten, wohl bekannt sein. Schon beim Trocknen der Substanz steht man vor einer Alternative, — entweder ein lange dauerndes Trocknen bei gewöhnlicher Temperatur und verhältnissmässig genaue Resultate zu erzielen, oder ein ziemlich schnelles Trocknen bei einem mehr oder weniger hohen Wärmegrad und sich mit ungenauen Resultaten zufrieden zu geben. Das Trocknen der Substanz ist für die Analyse von besonderer Wichtigkeit, weil der Aether Spuren von Wasser und mithin auch wasserlösliche Verbindungen aus der Substanz aufzunehmen vermag.

Von vielen Seiten wurde vorgeschlagen, die Substanz bei verschiedener Temperatur 50° bis 70° bis 100° zu trocknen. Argutinsky (1) empfiehlt das Trocknen bei gewöhnlicher Temperatur im Vacuum über Schwefelsäure vorzunehmen, wobei diese Methode auf Muskeln wie auf verschiedene andere Gewebe anwendbar ist und genauere Resultate erzielt als das Trocknen bei hoher Temperatur. Bogdanow (2) trocknet das Fleisch nach einem von Herrn Prof. N. Zuntz und Hagemann für Fett- und Kothanalyse viel benutzten Verfahren bei niedriger Temperatur in einem evacuirten

Raume über Schwefelsäure im Leuchtgasstrome, wobei das Gas zuerst mit Schwefelsäure gewaschen durch Kalilauge und Kalistücken durchgeleitet wird. Voit (3) führt die Trocknung auf folgende Weise aus: Die Substanz wird mit soviel Alkohol zusammengerührt, bis die Masse krümelig wird, und bleibt auf dem Wasserbade stehen, bis aller Geruch nach Alkohol verschwunden ist und die Masse pulverisirbar geworden ist, was ungefähr 15 Stunden dauert. Voit meint, dass manche bei einer Temperatur von unter 80° getrocknete Substanzen während des Pulverisirens Wasser anziehen und sich in Folge dessen schwer pulverisiren lassen. Die Wirkung des Alkohols beruht, wie Voit vermuthet, darauf, dass er osmotische Vorgänge einleitet, dadurch die in ihm löslichen Körper der Substanz entzieht und für weitere Eingriffe zugänglich macht. Die Substanz wird also dadurch entwässert, zugleich aber der Siedepunkt der Flüssigkeit herabgesetzt und so eine raschere und vollständigere Trocknung erzielt.

Wenn wir diese Trocknungsmethoden in Betracht ziehen, so müssen wir uns die Frage stellen: Was geschieht mit der Substanz bei hoher Temperatur? Verliert sie nur ihr Wasser oder noch andere in ihr enthaltene flüchtige Verbindungen, oder wird sie dabei auch zersetzt? Dass die Substanz bei einer Temperatur bis 100° einen Theil ihrer flüchtigen Verbindungen verliert, unterliegt keinem Zweifel. Unter diesen flüchtigen Verbindungen sind auch flüchtige Säuren anzunehmen, also schleicht sich bei der Feuchtigkeitsbestimmung ein bedeutender Fehler ein. Man findet auf solche Weise einen höheren Wassergehalt, als er in der That ist, und einen geringeren Fettgehalt, was für die Genauigkeit der Analyse nicht von besonderem Vortheil ist. Ob die Substanz eine Zersetzung erleidet, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, aber die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, dass die in der Substanz vorhandenen Fette bei 100° in der Gegenwart von Wasser oder, wie Voit verfährt, von Alkohol eine Spaltung erleiden. Es ist auch durchaus nicht unmöglich, dass sich unbekannte Spaltungsproducte bilden, die vom Aether mit extrahirt und als Fett bestimmt werden. Demnach ist ein mehr oder weniger hoher Wärmegrad nicht als indifferent zu betrachten und es ist, meiner Meinung nach, das Trocknen der Substanz in Vacuo bei gewöhnlicher Temperatur vorzuziehen.

Wenden wir uns nun zur Extraction der Fette. Wie bekannt, wurde von verschiedenen Autoren eine ganze Reihe von Methoden

mit Modificationen vorgeschlagen, die auf die Löslichkeit des Fettes in verschiedenen Lösungsmitteln, wie Aether, Alkohol, Chloroform und mehrere andere, und auf eine Lösung der Substanz mittelst Pepsin-Salzsäure, Kalilauge u. A. gegründet sind, wobei diejenige Methode als die beste betrachtet wird, die mehr in Aether lösliche Extractivstoffe gibt. Um einen vollständigen Ueberblick über die Methoden zu gewinnen, fand ich es für zweckmässig, sämmtliche Methoden in drei Gruppen einzuteilen: 1. Aetherextraction, 2. Verdauungsmethode oder Aufschliessungsmethode, und 3. Alkoholmethode (Alkoholbehandlung mit darauffolgender Aether- oder Chloroformextraction).

Zunächst wollen wir die Aetherextraction betrachten. Wie bekannt, ist es bis jetzt noch nicht gelungen, einen Endpunkt des Extrahirens mit Aether zu erreichen, und bei einer genauen Bestimmung bleibt nichts übrig, als die Extraction ad infinitum fortzusetzen. Zuerst hat Pflüger (4) den Versuch gemacht, den Endpunkt zu erreichen. Zu diesem Zweck extrahirte er im Soxleth-schen Apparate (5) fein gepulvertes Pferdefleisch vierzehn Tage lang, täglich ca. zehn Stunden, wobei er das gewonnene Fett von jedem Tage bestimmte und erhielt folgende Resultate: 3—5 g Trockensubstanz gaben am ersten Tage 120—150 mg, dann 2—20 mg, 3—10 mg und so jeden Tag langsam fallend bis 1—5 mg, die während der ganzen Dauer der Extraction constant blieben; auch bei einer Extraction von 4—5 Wochen blieb diese Zahl unverändert. Die Ursache dieser Erscheinung hat Pflüger nicht in der geringen Menge Aether gesucht, sondern im allzulangsamen Eindringen des Aethers in die thierische Substanz. Um bessere Resultate zu erzielen, übergoss er die gepulverte Substanz mit Aether und liess sie unter öfterem Umschütteln stehen. Beim ersten Auszuge, der einige Tage dauerte, hat er fast die ganze Menge Fett gewonnen. Bei ein- oder zweimaliger Wiederholung dieser Manipulation hat Pflüger das ganze Fett erhalten, d. h. den Endpunkt der Analyse erreicht.

Aus den Versuchen von Argutinsky stellt sich aber heraus, dass Pflüger's Resultate nicht vollständig genau sind. Nach wochenlangem Stehenlassen in kaltem Aether unter öfterem Umschütteln erhielt Argutinsky im Soxleth'schen Apparate noch bedeutende Extractmengen und nach achttägigem Extrahiren war die Substanz noch nicht vollständig entfettet. Argutinsky begnügte

sich mit diesen Resultaten und hielt die Extraction für beendet, da es ihm nicht gelungen ist, den Aether ohne Rückstand zu erhalten.

Auch Dormeyer (6) ist es nicht gelungen, eine vollständige Erschöpfung der Substanz an Fett durch Aetherextraction zu erreichen. Nach Monate langem Extrahiren im Soxhlet'schen Apparate erhielt er in den folgenden 38 Stunden noch 0,5 % der gesammten Extractmenge. Er erklärte auch diese Erscheinung durch das langsame Eindringen des Aethers in die Substanz und hält für nothwendig, diesen Umstand durch erneutes Pulverisiren zu beseitigen, wobei das Gewebe in seinem Zusammenhange und die einzelnen Zellen selbst zerstört werden.

Bogdanow nimmt die Möglichkeit an, dass ein Theil des Fettes durch die Substanz mechanisch zurückgehalten wird, denn die feingepulverte Substanz bildet im Soxhlet'schen Apparate eine hohe Säule mit feinsten Poren, durch die jede Fettlösung verschieden lange Strecken durchzugehen hat, sie kann also mehr oder weniger als eine poröse Platte veränderlicher Dicke wirken. Zur Prüfung dieser Annahme stellte er folgenden Versuch an: Eine Patrone war mit feinem Seesand gefüllt, der mit etwas Kreide gemischt war. Obenauf wurden 1,6692 g Mandelöl und 3,392 g Stearinsäure gebracht und alles mehr als eine Woche extrahirt. Nach siebentägigem Extrahiren enthielt die Patrone nur noch 0,0022 g.

Die Thatsache, dass $^3/_5$ des gesammten Fettes innerhalb weniger Stunden extrahirbar sind, während der Rest nur langsam gewonnen werden kann, brachte Dormeyer auf den Gedanken, dass verschiedene Arten von Fett in den Muskeln vorhanden sind, nämlich: der leicht extrahirbare Teil des Fettes, der als Reservestoff in dem interstitiellen Bindegewebe aufgespeichert ist, und der erst nach vollständiger Desorganisation des Gewebes extrahirbare Teil, der sich in dem Muskelparenchym vorfindet.

Dieser Gedanke beschäftigte auch Bogdanow, und er hat eine Reihe von Versuchen angestellt, um die chemische Zusammensetzung der nach einander gewonnenen Aetherextracte des Fleisches zu bestimmen und dadurch zu beweisen, dass zwei Arten von Fett in dem Muskelfleisch vorhanden sind. Bogdanow beobachtete in seinen Versuchen, dass der Gehalt an freien und flüchtigen Säuren mit der Dauer der Extraction bedeutend zugenommen hat. Dieses fast regelmässige Auftreten von freien und flüchtigen Fettsäuren führte ihn zu der Annahme, dass das zuletzt extrahirbare Fett ein

von dem zuerst gewonnenen verschiedenes ist. Der Umstand, dass das Fett während der Extraction möglicher Weise eine Zersetzung erleidet, die als Ursache der Zunahme der freien und flüchtigen Fettsäuren betrachtet werden könnte, veranlasste Bogdanow einen Versuch anzustellen, um festzusetzen, wie gross die Differenzen sind. Zu diesem Zwecke wird das aus Pferdefleisch gewonnene Fett 6 Tage lang im Soxhlet'schen Apparate erwärmt.

	Vor d. Erwärmen	Nach d. Erwärmen
Flüchtige Fettsäuren	0 %	2,39 %
Freie Fettsäuren	12,78 %	14,34 %
Verseifbares	86,88 %	80,11 %
	99,66 %	96,84 %.

Das Ergebniss dieses Versuches bestätigte nur Bogdanow's Annahme, denn die Differenzen im Vergleich mit den bei der Extraction auftretenden freien und flüchtigen Fettsäuren (Bogdanow fand in den späteren Auszügen ca. 200 % freie Fettsäuren) sind derart gering, dass man diese auffallende Erscheinung unmöglich auf eine Zersetzung des Fettes während der Extraction zurückführen kann. Bogdanow nimmt an, dass die zuletzt extrahirbaren Fettmengen, die also besonders schwer aus dem Fleische zu entfernen sind, des grossen Gehaltes an flüchtigen Fettsäuren wegen näher dem Butterfett als dem des thierischen Fettgewebes stehen.

Voit meint, dass es nicht nothwendig wäre, eine Verschiedenheit in der Zusammensetzung des Fettes in dem Bindegewebe und den Muskelzellen anzunehmen, wenn wir das in Betracht ziehen, dass Verunreinigungen, die aus in Aether schwer löslichen und auch in Wasser löslichen Stoffen bestehen, vom Aether nur langsam ausgezogen werden und dann in relativ grösserer Menge auftreten, wenn das Fett zum grössten Theil ausgezogen ist. Solche Stoffe entstehen auch zum Theil erst bei der Extraction durch Zersetzung des Fettes oder auch von anderen Substanzen unter dem Einflusse der ständigen Aetherverdunstung. Die Zersetzung würde natürlich an der Stelle am bedeutendsten sein, die für den Sauerstoff am leichtesten zugänglich ist, das ist in der Hülse des Cylinders, die zur Aufnahme der Substanz dient. Sie würde aber auch in dem Fettkölbchen selbst eintreten können.

Wenden wir uns zur Verdauungs- oder Aufschliessungsmethode.

Pflüger (4) kam zuerst auf den Gedanken, das Gewebe in Citronensäure aufzulösen und auf solche Weise das gesammte Fett

zu gewinnen. Die thierischen Organe, sogar die grob zerschlagenen Knochen, werden auf dem Wasserbade in einer 5 bis 20 %igen Citronensäurelösung zur Auflösung gebracht. Das Fett kann nach dem Erkalten abgeschöpft und die saure Lösung mit Aether ausgeschüttelt werden, in dem die Citronensäure fast unlöslich ist. Die Aetherauszüge schüttelt man mit Wasser aus und verdunstet sie. Diese Methode scheint keine genügenden Resultate gegeben zu haben, da sie wenig angewandt wird.

Das ewig dauernde Extrahiren veranlasste Dormeyer, eine bessere, zuverlässigere Methode vorzuschlagen. Er betrat denselben Weg wie Pflüger; seine Methode besteht im Wesentlichen auch in einer Erschliessung der Substanz. Fein pulverisirte, in Vacuo getrocknete Substanz wird 4 bis 6 Stunden im Soxhlet'schen Apparate mit Aether extrahirt, um die Hauptmenge des Fettes aus der Substanz zu entfernen. Das hält Dormeyer für nothwendig, da die Substanz nach Entfernung der Hauptmenge des Fettes leichter zu pulverisiren ist und dadurch eine homogene Mischung ermöglicht wird; ausserdem wirkt ein grosser Fettgehalt störend auf die Verdauung ein. Aus der bereits mit Aether extrahirten, auf's Feinste pulverisirten und durchgemischten Substanz wird ein Theil, 2 bis 4 g, entnommen, mit 100 ccm der Verdauungsflüssigkeit verrührt und einer Temperatur von 37° bis 38° ausgesetzt. Die Verdauungsflüssigkeit wird aus Schweine- oder Hundemägen mit 0,5 %iger Salzsäure bereitet oder aus käuflichem Pepsin und Salzsäure (0,1 % Pepsin, 0,5 % Salzsäure) hergestellt. Die Dauer der Einwirkung ist bei Anwendung eines Magenschleimhautauszuges $^3/_4$ bis 2 Stunden, dagegen bei einem Pepsinpräparate 10 bis 24 Stunden. Da ein Theil der Substanz unverdaut bleibt, so muss man die Flüssigkeit filtriren, den Rückstand im Exsiccator trocknen und dann im Soxhlet'schen Apparate mit Aether ca. 40 Stunden extrahiren. Die von der Verdauung erhaltene Flüssigkeit wird mehrere Mal mit Aether ausgeschüttelt.

Athanasiu (7) fand Dormeyer's Verfahren für sehr umständlich, unbequem, und hat deshalb in seinen Versuchen die Methode einigermaassen vereinfacht. Er unterwirft die Frösche unmittelbar nach ihrem Tode, ohne sie getrocknet zu haben, der künstlichen Verdauung. Auf 250 g frische Substanz brauchte er 1 g Pepsin in 1 Liter 0,5 %iger Salzsäure gelöst.

Durch die Einführung des Percolators von Nerking (8) ge-

staltete sich die Verdauungsmethode einfacher und bequemer. Die künstlich verdaute Substanz wird anstatt der umständlichen und unsicheren Ausschüttelung, bei der Verluste unvermeidlich sind, der Behandlung im Percolator unterworfen. Die Resultate, die Nerking erhalten hat, übertreffen die der Dormeyer'schen Ausschüttlungsmethode. Dieses Verfahren bietet aber auch keinen geringeren Zeitaufwand.

Nerking versuchte auch den Verdauungsprocess dadurch zu ersetzen, dass er die Substanz mit 2 %iger Salzsäure auf dem Wasserbade während dreier Stunden kocht und dann 48 Stunden mit Aether extrahirt. Der ungelöste Rückstand kann mit extrahirt werden, oder er wird getrocknet und ca. 24 Stunden im Soxhlet'schen Apparate extrahirt, oder er wird auch nach dem Trocknen und Auswaschen mit warmem Aether mittelst 1 %iger Sodalösung gelöst und zusammen mit dem Filter im Nerking'schen Apparate extrahirt.

Die Frage, ob die in der Substanz enthaltenen Fette und Fettsäuren beim Kochen mit 2 %iger Salzsäure eine Zersetzung erleiden, lässt sich schwer beantworten. Zur Entscheidung dieser Frage hat Nerking Versuche mit thierischem Fett angestellt. Das Fett wurde durch vorhergehende Behandlung mit 4 %iger Natriumcarbonatlösung von den vorhandenen Fettsäuren absolut befreit und mit 2 %iger Salzsäure im kochenden Wasserbade drei Stunden behandelt. Das Ergebniss dieser Versuche war durchaus befriedigend. Nerking hat keine sichtbaren Veränderungen des Fettes beobachten können. Wie verhalten sich aber diese Resultate zu den analogen Bogdanow'schen? Eine Veränderung des Fettes in Bogdanow's Versuchen hat, wie wir gesehen haben, zweifellos stattgefunden. Vergleichen wir nun die Temperatur in den Versuchen von Nerking und Bogdanow, so sehen wir, dass Nerking das Fett auf 110° erhitzt hatte, während Bogdanow nur auf 35°, also müsste man eine Zersetzung desto eher annehmen; ausserdem ist die Salzsäure, wenn auch von so geringer Concentration, nicht als vollständig indifferentes Mittel zu betrachten. In dem Falle muss man auch das berücksichtigen, dass die Substanz ausser den Fetten noch andere Körper enthält, die beim Kochen mit Salzsäure eine Veränderung erleiden können und wahrscheinlich auch ihrerseits eine Wirkung auf die Fette ausüben.

Die Voit'sche (3) Modification weicht von der Dormeyerschen Methode schon darin ab, dass Voit stets 4 g Substanz zuerst

mit Aether extrahirt und dann mit Pepsin-Salzsäure aufschliesst. Die Herstellung der Verdauungsflüssigkeit wird auf folgende Weise ausgeführt: Die Schleimhaut von drei Schweinemägen wird fein zerwiegt, mit 3 Liter 0,4 %iger Salzsäure zwei Tage stehen gelassen, dann kolirt und filtrirt. Zu der Flüssigkeit werden 6 ccm Chloroform hinzugefügt, um dieselbe längere Zeit unverändert aufbewahren zu können. Auf 4 g Substanz werden 300 ccm dieser Verdauungsflüssigkeit mit 300 ccm Wasser gebraucht; die Verdauung dauert 48 Stunden im Brutofen. Voit beobachtete, dass nach kurzer Zeit nur ein geringer Bodensatz zu sehen ist und dass nach dem Filtriren nur ein kleiner Belag auf dem Filter zurückbleibt. Der Aetherextract wird durch Lösen in Petroleumäther gereinigt.

Unlängst wurde eine neue Modification der Dormeyer'schen Methode von Schlesinger (9) veröffentlicht. Die Modification besteht darin, dass man kleine Mengen Substanz, ca. 1 g, anwendet, mit Aether extrahirt, der künstlichen Verdauung in 300 ccm Flüssigkeit im Thermostaten bei 37° bis 38° unterwirft und dann nach der Dietrich'schen oder Adam'schen Methode, analog wie die Milch, behandelt, d. h. die Flüssigkeit wird von zwei fettfreien Papierstreifen oder Watte aufgesaugt, getrocknet und zehn Stunden im Soxhlet'schen Apparate extrahirt.

Durch die Verdauungsmethode erhält man also bedeutend mehr Extractivstoffe als durch die gewöhnliche Aetherextraction. Was ist aber nun der durch die Verdauung erhaltene Extract? Besteht er nur aus Fett und Fettsäuren oder enthält er auch Beimengungen? Schon durch das längere Extrahiren im Soxhlet'schen Apparate werden in Aether schwer lösliche Stoffe in nachweisbarer Menge gewonnen, wenn man die Aethermengen berechnet, die die Substanz während der Extraction durchfliessen. Voit (3) behauptet, dass in einer Stunde die Substanz 500 ccm Aether umspülen. Ausserdem ist noch auch das in Betracht zu ziehen, dass der Aether nicht vollständig wasserfrei ist und ein Teil wasserlöslicher Körper mit in Lösung geht. Es werden desshalb auch beim Ausschütteln der sauren Verdauungsflüssigkeit erhebliche Mengen anderer Substanzen mit gelöst.

Um das so erhaltene Fett von den Beimengungen zu befreien, empfiehlt Voit, die Aetherauszüge mit Petroleumäther zu reinigen. Wenn man demnach nur die fettartige Substanz ohne die Beimengungen in Rechnung zieht, so erhält man nach Voit's Angabe,

durch die Verdauung eine Erhöhung des Fettgehaltes von höchstens 2 % des Gesammtfettes. Das ist, wie Voit meint, eine so geringe Differenz, dass man sie bei den meisten Untersuchungen vernachlässigen kann. Erhalten wir denn durch Auflösen in Petroleumäther reines Fett? Auf diese Frage werde ich noch Gelegenheit haben, zurückzukommen.

Denselben Weg wie Pflüger betreten auch Liebermann und Szekely (10). Ihrer Methode liegt zu Grunde dasselbe Princip — die Erschliessung der Substanz mit dem Unterschiede, dass hier das Fett durch Kalilauge frei gemacht wird. Die Methode besteht im Folgenden: 5 g Substanz werden mit 30 ccm 50 %iger Kalilauge ½ Stunde gekocht, nach dem Abkühlen fügt man 30 ccm Alkohol hinzu und nach zehn Minuten langem Kochen versetzt man das Gemenge mit 100 ccm 20 %iger Schwefelsäure, wobei die Flüssigkeit abgekühlt wird. Die völlig erkaltete Flüssigkeit wird mit 50 ccm Petroleumäther ausgeschüttelt und unter Umschütteln in Intervallen von 1 bis 2 Minuten eine Stunde stehen gelassen. Nach Zusatz einer gesättigten Kochsalzlösung werden 20 ccm Petroleumäther abpipettirt, mit 40 ccm säurefreiem 96 %igen Alkohol und 1 ccm Phenolphthaleïn versetzt und mit $\frac{n}{10}$ alkoholischer Kalilauge titrirt. Die Seifen werden nach dem Verdunsten des Petroleumäthers und Alkohols bestimmt. Aus der verbrauchten Menge Kalilauge, dem Gewicht der Seifen und der angewandten Substanz wird mittelst einer zu diesem Zwecke aufgestellten Formel der Fettgehalt in Procenten ausgerechnet.

Wie bei allen Methoden der Fettbestimmungen, so kann man auch hier die merkwürdige Thatsache constatiren, dass nicht alle Autoren übereinstimmende Resultate erhalten; der eine findet mehr, der andere weniger. Dass die Beimengungen nach dieser Methode grösser sind, ist höchst wahrscheinlich, da concentrirte Kalilauge nicht nur auf die Fette, sondern auch auf die ganze Substanz zersetzend wirkt und der Petroleumäther kein sicheres Schutzmittel gegen das Eindringen fremder Körper ist.

Die dritte Methode besteht in einer Alkoholvorbehandlung mit darauffolgender Aether- oder Chloroformextraction.

Die umständliche Verdauungsmethode veranlasste nach einem leichteren und kürzeren Verfahren zu suchen. Bogdanow (11) constatirte zuerst, dass man durch Kochen mit Alkohol viel mehr

ätherlösliche Substanzen gewinnen kann als durch das gewöhnliche Extrahiren mit Aether allein. Die Substanz wird zuerst von der Hauptmenge des Fettes durch mehrtägiges Stehen in Aether befreit, fein pulverisirt und längere Zeit (3 Tage) mit 90 %igem Alkohol gekocht oder im Soxhlet'schen Apparate extrahirt. Der Extract wird dann durch Auflösen in kaltem Aether gereinigt. Bogdanow erhielt sehr gute Resultate: seine zwei Proben mit Fleisch gaben in einem Falle 11,486 % und im anderen — 12,822 %, während die Vergleichsprobe mit Aether nur 6,65 % gab.

Das Voit'sche Verfahren habe ich im Wesentlichen bei der Trocknung der Substanz besprochen. Es bleibt noch hier zu erwähnen, dass die getrocknete Substanz 24 Stunden mit Aether extrahirt wird, der Extract dann mit Petroleumäther gereinigt.

Noel-Paton (12) lässt die Substanz eine Woche lang in kaltem Aether stehen, dann wird die Substanz fein zerrieben, zusammen mit dem Aether auf dem Wasserbade eingedampft und 12 Stunden im Soxhlet'schen Apparat extrahirt.

Frank (13) lässt die Substanz in 96 %igem Alkohol unter öfterem Umschütteln stehen; nach 24 Stunden wird die Flüssigkeit decantirt und diese Manipulation drei Mal mit absolutem Alkohol und zwei Mal mit Aether wiederholt. Der Rückstand wird auf dem Wasserbade von dem Aether befreit, fein pulverisirt und mit Aether 24 Stunden im Soxhlet'schen Apparate extrahirt Sämmtliche Flüssigkeiten werden abgedampft, und der so erhaltene Extract wird mit Aether oder Petroleumäther gereinigt.

Ferner haben Schlesinger und Rosenfeld (14) als Extractionsmittel Chloroform angewendet und gelangten, wie sie behaupten, zu glänzenden Resultaten. Rosenfeld verfährt derart, dass er 20 g Substanz in der Patrone zusammengebunden in absolutem Alkohol auf dem Wasserbade ½ Stunde auskocht, die Patrone wird dann in den Soxhlet'schen Apparat gesetzt und 6 Stunden mit Chloroform extrahirt. Der Alkohol- und Chloroformauszug werden eingedampft, der Rückstand mit absolutem Aether oder Petroleumäther aufgenommen, filtrirt und nach Verjagen des Aethers gewogen.

Betrachten wir nun diese Methoden, die sich zur Aufgabe gemacht haben, die Dormeyer'sche Methode zu verdrängen, so fällt uns die bemerkenswerthe Thatsache auf, dass nach den sämmtlichen Methoden eine beträchtliche Menge Extract durch die darauf-

folgende Verdauung zu gewinnen ist. Auch nach der Rosenfeld-schen Methode, nach der er die höchste Procentzahl Extract erhalten hat, beobachten wir dieselbe Erscheinung. Noch bemerkenswerther ist die Thatsache, dass auch nach 35 stündigem Extrahiren mit Chloroform und abwechselnder Auskochung in Alkohol noch 0,23 % Extract durch die Verdauung gewonnen werden. Daraus folgt, dass sich entweder durch die Verdauung immer ätherlösliche fremde Körper bilden oder durch das Chloroform nicht die ganze Menge Fett zu erhalten ist. Diese Frage lässt sich nicht ohne Weiteres entscheiden, und ich werde noch die Gelegenheit haben, darauf zurückzukommen.

II. Experimenteller Theil.

A. Prüfung der üblichen Methoden.

Nun stehen wir vor einer ganzen Reihe von Methoden und Modificationen, und sind nicht im Stande, zu entscheiden, welche von diesen die eigentlich sicherste, zuverlässigste ist, d. h. nach welcher Methode erhalten wir verhältnissmässig mehr und reineres Fett. Um diese Frage zu beantworten, muss man zunächst die chemische Zusammensetzung des nach verschiedenen Methoden gewonnenen Fettes untersuchen, und das war die Aufgabe, die mir Herr Prof. Zuntz vorgeschlagen hat. Zu diesem Zwecke habe ich eine Reihe von Versuchen mit käuflichem Fleischmehl angestellt. Das Fleischmehl wurde im Vacuo bei 60—65° mehrere Tage getrocknet, bis es noch 1,5 % Wasser enthielt. Vor jedem Versuche wurde die Patrone mit Fleischmehl circa 2 Stunden im Trockenschranke getrocknet, so dass nahezu absolut trockene Substanz zur Anwendung gelangte. Ich erhielt folgende Resultate:

Soxhlet.

Versuch I.

Angewandte Substanz 11,666 g.

12 stünd. Extr.	1,5956 g Fett	=	13,67 %
24 „ „	0,0236 g „	=	0,2 %
36 „ „	0,0124 g „	=	0,106 %
72 Stunden	1,6316 g Fett	=	13,976 %
Petrolätherlöslich	1,5254 g „		13,076 %

Versuch II.

Angewandte Substanz 11,8468 g.

12 stünd. Extr.	1,6092 g	Fett =	13,58 %
24 „ „	0,0232 g	„ =	0,19 %
36 „ „	0,0112 g	„ =	0,094 %
72 Stunden	1,6436 g	Fett =	13,864 %
Petrolätherlöslich	1,5370 g	„	12,964 %

Dormeyer:

Angewandte Substanz 26,72 g.

6 stünd. Extr.	3,3386 g	Fett =	12,49 %
Petrolätherlöslich.	3,2584 g	„	12,19 %

Verdauungsversuch I.

Angewandte Substanz 4,1396 g.

Aus der Lösung mit Aether ausgeschüttelt	0,0290 g =	0,72 %
Rückstand mit Aether extrahirt	0,0442 g =	1,06 %
	0,0732 g =	1,78 %
Aetherextract		12,49 %
Rohfett		14,27 %
Petrolätherlöslich	0,0488 g =	1,20 %
		12,19 %
		13,39 %

Verdauungsversuch II.

Angewandt für die Verdauung 4,0076 g.

Aus der Lösung mit Aether ausgeschüttelt	0,0384 g =	0,96 %
Rückstand mit Aether extrahirt	0,0565 g =	1,41 %
	0,0949 g =	2,37 %
Aetherextract.		12,49 %
Rohfett		14,86 %
Petrolätherlöslich	0,0633 g =	1,59 %
Aeterextract		12,19 %
		13,78 %

Verdauungsversuch III.

Angewandte Substanz für die Verdauung 4,0984 g.

Aus der Lösung mit Aether ausgeschüttelt	0,0336 g =	0,817 %
Rückstand mit Aether extrahirt	0,0370 g =	0,9 %
	0,0706 g =	1,717 %
Aetherextract		12,49 %
Rohfett		14,207 %
Petrolätherlöslich	0,0470 g =	1,14 %
		12,19 %
		13,33 %

E. Voit.

Versuch I.

Angewandte Substanz 4,0288 g.

24 stünd. Extr.	0,5186 g	Fett =	12,87 %
Petrolätherlöslich	0,4893		12,14 %

Versuch II.

Angewandte Substanz 4,6284 g.

24 stünd. Extr.	0,5842 g	Fett =	12,60 %
Petrolätherlöslich	0,5592 g		12,08 %

Versuch III.

Angewandte Substanz 6,1422 g.

24 stünd. Extr.	0,7886 g	Fett =	12,839 %
Petrolätherlöslich	0,7438 g	„ =	12,10 %

Bogdanow.

Versuch I.

Angewandte Substanz 9,5604 g.

1 täg. Stehen im Aether . .	0,4972 g	Fett =	5,2 %
4 täg. „ „ „ . .	0,1788 g	„ =	1,87 %
12 stünd. Extr. m. Alk. . .	0,5584 g	„ =	5,84 %
12 stünd. „ „ „ . .	0,1874 g	„ =	1,96 %
12 stünd. „ „ „ . .	0,0114 g	„ =	0,12 %
	1,4332 g	„	14,99 %
Petrolätherlöslich	1,3442 g		14,06 %

Versuch II.

Angewandte Substanz 8,7248 g.

1 täg. Stehen im Aether. .	0,4458 g	Fett =	5,109 %
4 täg. „ „ „ . .	0,1500 g	„ =	1,72 %
12 stünd. Ausk. in Alk.. .	0,5374 g	„ =	6,163 %
12 stünd. „ „ „ . .	0,1196 g	„ =	1,37 %
12 stünd. „ „ „ . .	0,0082 g	„ =	0,094 %
	1,2610 g		14,456 %
Petrolätherlöslich	1,1819 g		13,55 %

Versuch III.

Angewandte Substanz 10,2094 g.

1 täg. Stehen in Aether . .	0,4920 g	Fett =	4,819 %
4 täg. „ „ „ . .	0,1634 g	„ =	1,6 %
12 stünd. Ausk. in Alk.. .	0,6024 g	„ =	5,9 %
12 stünd. „ „ „ . .	0,1838 g	„ =	1,8 %
12 stünd. „ „ „ . .	0,0206 g	„ =	0,2 %
	1,4622 g		14,319 %
Petrolätherlöslich	1,3804 g		13,52 %

Rosenfeld:

Versuch I.

Angewandte Substanz 6,9884 g.

½ Stunde Auskochen in Alkohol und 6 Stunden Extrahiren mit Chloroform	1,3208 g Fett	= 18,89 %
Petrolätherlöslich.	1,2566	17,96 %

Versuch II.

Angewandte Substanz 7,7492 g.

½ Stunde Auskochen in Alkohol und 6 Stunden Extrahiren mit Chloroform	1,4506 g Fett	= 18,70 %
Petrolätherlöslich.	1,3784 g	17,78 %

Liebermann-Szekely:

Versuch I.

Angewandte Substanz 5,1210 g.

Verbr. $\frac{n}{10}$ Kalilauge . . . . . 112,25 ccm

Seife . . . . . 0,5960 g

$$f = \left[\frac{0{,}5960 - 0{,}01 - (112{,}25 \times 0{,}00255)}{5{,}121}\right] 250 = 14{,}63\,\%$$

Versuch II.

Angewandte Substanz 4,9268 g.

Verbr. $\frac{n}{10}$ Kalilauge. . . . . 108,85 ccm

Seife . . . . . 0,5782 g

$$f = \left[\frac{0{,}5782 - 0{,}01 - (0{,}00255 \times 108{,}85)}{4{,}9268}\right] 250 = 14{,}75\,\%$$

(Siehe Tabelle I S. 15.)

Sämmtliche Extracte wurden nach dem Verdunsten des Lösungsmittels in Petroleumäther gelöst, um die Beimengungen zu entfernen; ausserdem ermöglicht dies auch den Vergleich der verschiedenen Methoden. Aus den angeführten Zahlen ist ersichtlich, dass man nach der Rosenfeld'schen Methode bei einem bedeutend geringerem Zeitaufwand eine bedeutend höhere Procentzahl Extract gewinnt, während nach den übrigen verhältnissmässig geringere Extractmengen zu erhalten sind. Zur Erklärung dieses Unterschiedes ist in Betracht zu ziehen, dass die Lösungsmittel, die bei den verschiedenen Methoden zur Anwendung gelangen, grundverschieden von einander sind, schon durch ihre Siedepunkte, nämlich: Aether 35 °, Alkohol 78,3 °, Chloroform 61,5 °.

Tabelle I.

	Versuch	Angew. Substanz	Extractionsdauer Stunden	Rohfett	Reinfett	Mittelwerth
Soxhlet . . .	I	11,6660	72	13,970 %	13,07 %	13,00 %
	II	11,8468	72	13,864 %	12,964 %	
Dormeyer . .	I	4,1396	—	14,270 %	13,39 %	13,50 %
	II	4,0076	—	14,860 %	13,78 %	
	III	4,0984	—	14,207 %	13,33 %	
E. Voit	I	4,0288	24	12,870 %	12,14 %	12,11 %
	II	4,6284	24	12,600 %	12,08 %	
	III	6,1422	24	12,839 %	12,10 %	
Bogdanow . .	I	9,5604	96	14,990 %	14,06 %	13,71 %
	II	8,7248	96	14,456 %	13,55 %	
	III	10,2094	96	14,319 %	13,52 %	
Rosenfeld . .	I	6,9884	7	18,890 %	17,96 %	17,87 %
	II	7,7492	7	18,700 %	17,78 %	
Liebermann .	I	5,1210	—	—	14,63 %	14,69 %
	II	4,9268	—	—	14,75 %	

Nun kommt es hier nicht allein auf die Quantität, sondern auch auf die Qualität des Extractes an. Wir müssen also feststellen, ob z. B. zwischen dem Rosenfeld'schen und Voit'schen Extract die Differenz von 5,75 % wirklich nur aus reinem Fett besteht, ob das Mehr nicht fremde, in Petroleumäther lösliche Körper sind und ob nicht das Chloroform, als stärkeres Lösungsmittel im Vergleich zum Aether, eine intensivere Veränderung des Fettes hervorruft.

Da alle Fette eine nahezu gleiche qualitative Zusammensetzung besitzen und sich nur durch das Mischungsverhältniss der Fettsäuren unterscheiden, können nur die Untersuchungsmethoden in Betracht kommen, denen eine Quantitätsbestimmung zu Grunde liegt. Aus der quantitativen Bestimmung oder aus dem quantitativen Verhalten des Fettkörpers sind Schlüsse auf die Natur und Reinheit des Fettes zu ziehen. Bei der Prüfung und Untersuchung der Fette kommen als die bequemsten quantitativen Methoden in Betracht die Bestimmung des Gehaltes an freien und flüchtigen Fettsäuren. Die von mir zu diesem Zwecke ausgeführten Analysen der nach verschiedenen Methoden gewonnenen Fette gaben folgende Resultate.

1) Von allen Analysen, die ich ausgeführt habe, gebe ich nur diejenigen an, bei denen ich keinen Fehler begangen zu haben glaube.

Freie Fettsäuren.

Zur Ermittlung der freien Fettsäuren dient die Säurezahl (15), die die Menge Kalihydrat oder die Anzahl Milligramme Kalihydrat für 1 g Fett angibt, die zur Neutralisation der in einem Fett befindlichen freien Fettsäuren nothwendig ist und bildet daher ein Maass für den Gehalt des Fettes an freien Fettsäuren. Zur Bestimmung der Säurezahl titrirt man nach Merz (16) das in Aether-Alkohol gelöste Fett mit $\frac{n}{10}$ alkoholischer Kalilauge unter Benutzung von Phenolphthaleïn als Indicator. Der Endpunkt der Titration ist ganz scharf zu erkennen, indem eine Verseifung des Neutralfettes durch den zuletzt zugesetzten, ganz geringen Ueberschuss an Alkali nicht eintritt.

$$s = \frac{m \times n}{a} \cdot 1000$$

wo s = Säurezahl, m = Titer der Kalilauge, n = verbrauchte Kubikcentimeter, a = Menge Fett.

Aus der Säurezahl s lässt sich nach Haussmann (17) der Gehalt f des Fettes an freien Fettsäuren berechnen, sobald man das Molekulargewicht m der freien Fettsäuren kennt.

$$56 : m = \frac{s}{10} : f. \qquad f = \frac{ms}{560}$$

Wir nehmen an, dass das mittlere Molekulargewicht der in Betracht kommenden freien Fettsäuren dem der Oelsäure gleich ist.

Die Prüfung ergab folgende Resultate:

Soxhlet:

5,9544 g Fett gelöst zu 250 ccm Aether (2 Theile) — Alkohol (1 Theil) und titrirt je 50 ccm = 1,1908 g mit alkohol. $\frac{n}{10}$ Kalilauge (6,2 ccm)

$$s = \frac{0{,}0056 \times 6{,}2}{1{,}1908} \cdot 1000 = 29{,}15$$

$$56 : 282 = \frac{29{,}15}{10} : f.$$

$$f = \frac{282 \cdot 29{,}15}{560} = 14{,}67\ \%.$$

E. Voit.

2,8326 g Fett gelöst zu 250 ccm Aetheralkohol und titrirt je 50 ccm = 0,3399 g. Verbrauchte Kalilauge 1,4 ccm.

$$s = \frac{0{,}0056 \times 1{,}4}{0{,}3399} \cdot 1000 = 23{,}06.$$

$$56 : 282 = \frac{23{,}06}{10} : f.$$

$$f = \frac{282 \cdot 23{,}06}{560} = 11{,}6\ \%.$$

Rosenfeld:

4,0898 g Fett gelöst zu 250 ccm Aether-Alkohol und titrirt je 50 ccm = 0,8179 g. Verbrauchte Kalilauge 4,7 ccm.

$$s = \frac{0{,}0056 \cdot 4{,}7}{0{,}8179} \cdot 1000 = 32{,}17.$$

$$56 : 282 = \frac{32{,}17}{10} : f.$$

$$f = \frac{282 \cdot 32{,}17}{560} = 16{,}2\ \%.$$

Flüchtige Fettsäuren.

Reichert-Meissl'sche Zahl (18).

Die Reichert-Meissl'sche Zahl bezeichnet die Anzahl Kubikcentimeter $\frac{n}{10}$ Natronlauge, die zur Neutralisation der aus 5 g Fett gewonnenen flüchtigen Fettsäuren nothwendig ist.

5 g Fett werden in einem etwa 200 ccm fassenden Kolben mit 2 g festem Aetzkali und 50 ccm 70 %igem Alkohol unter Umschütteln am Wasserbade bis zum Verschwinden der öligen Tröpfchen erhitzt und die klare Seifenlösung sodann bis zur vollständigen Verflüchtigung des Alkohols eingedampft. Den erhaltenen dicken Seifenleim löst man in 100 ccm Wasser und zersetzt mit 40 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 : 10). Der Kolben wird mit zwei erbsengrossen Bimsteinstückchen beschickt und sogleich mit dem Kühler verbunden. Hierzu dient ein 0,7 cm weites Glasrohr, das 1 cm über dem Kork zu einer Kugel von 2—2,5 cm Durchmesser aufgeblasen und unmittelbar darauf in einem stumpfen Winkel nach oben umgebogen ist, dann 5 cm lang in dieser Richtung verläuft und nochmals in einem stumpfen Winkel schräg nach unten abbiegt. Die Mischung im Kolben wird zunächst von einer ganz kleinen Flamme erwärmt, bis die unlöslichen Fettsäuren zu einer durchsichtigen klaren Masse geschmolzen sind, worauf man genau 110 ccm in einen Messkolben abdestillirt, dann filtrirt und vom Filtrate 100 ccm nach Zusatz einiger Tropfen Phenolphthaleinlösung mit $^1/_{10}$

Normal-Natronlauge titrirt. Die Anzahl der verbrauchten Kubikcentimeter Natronlauge wird um $^1/_{10}$ vermehrt, um der Gesammtmenge des Destillates zu entsprechen.

Soxhlet.

Versuch I.

5,9928 g Fett, dazu verbr. $\frac{n}{10}$ NaOH—**0,7** ccm

$$40 : 282 = 0{,}7 \times 0{,}004 : x. \quad x = 0{,}0197$$
$$5{,}9928 : 0{,}0197 = 100 : y. \quad y = 0{,}33\,\%.$$

Versuch II.

4,9536 g Fett, dazu verbr. $\frac{n}{10}$ NaOH—**0,60** ccm

$$4{,}9536 : \frac{282 \cdot (0{,}6 \times 0{,}004)}{40} = 100 : x. \quad x = 0{,}34\,\%$$

E. Voit.

Versuch I.

4,558 g Fett, dazu verbr. $\frac{n}{10}$ NaOH **0,55** ccm

$$4{,}558 : \frac{282\ (0{,}55 \times 0{,}004)}{40} = 100 : x. \quad x = 0{,}34\,\%.$$

Versuch II.

4,3092 g Fett, dazu verbr. $\frac{n}{10}$ NaOH **0,5** ccm

$$4{,}3092 : \frac{282\ (0{,}5 \times 0{,}004)}{40} = 100 : x. \quad x = 0{,}33\,\%.$$

Rosenfeld:

Versuch I.

4,5684 g Fett, dazu verbr. $\frac{n}{10}$ NaOH **1,8** ccm

$$4{,}5684 : \frac{282\ (1{,}8 \times 0{,}004)}{40} = 100 : x. \quad x = 1{,}1\,\%.$$

Versuch II.

4,7582 g Fett, dazu verbr. $\frac{n}{10}$ NaOH **1,8** ccm

$$4{,}7582 : \frac{282\ (1{,}8 \times 0{,}004)}{40} = 100 : x. \quad x = 1{,}06\,\%.$$

Tabelle II.

	Schmelzpunkt	In 100 g Fett		In 100 g Substanz	
		Freie Fettsäuren	Flüchtige Fettsäuren	Freie Fettsäuren	Flüchtige Fettsäuren
Soxhlet	43,0°	14,67	0,34	1,90	0,04
E. Voit	41,5°	11,6	0,34	1,40	0,04
Rosenfeld	39,0°	16,2	1,08	2,89	0,19

Zu den Untersuchungen physikalischer Natur gehört in erster Linie die Bestimmung des Schmelzpunktes. Wie in allen chemischen Verbindungen so ist auch bei den thierischen Fetten der Schmelzpunkt ein entscheidender Factor bei der Prüfung auf deren Reinheit. Da die Fette von den individuellen Eigenschaften und der Fütterung der Thiere abhängig sind, wie es z. B. vorkommt, dass das Fett bei zwei Individuen einer und derselben Gattung in der Constitution abweicht, so haben wir auch keinen eigentlichen Maassstab, nach dem wir uns richten könnten. Um einen gewissen Anhaltspunkt bei der Beurtheilnng der oben angeführten Schmelzpunkte zu haben, können wir als Vergleichsobject das Rinderfett wählen, weil das von mir angewandte Fleischmehl dem Rindfleisch entstammt. Vergleichen wir nun diese Schmelzpunkte mit dem des Rinderfettes (45° bis 46°), so sehen wir, dass das Soxhlet'sche Fett am nächsten, das Voit'sche in der Mitte steht, während das Rosenfeld'sche den niedrigsten Schmelzpunkt hat, also am meisten von der Zusammensetzung des Rinderfettes abweicht.

Was die freien und flüchtigen Fettsäuren betrifft, so wissen wir, dass dieselben im ausgeschmolzenen Talg des Rindes nicht vorhanden sind, dass deren Anwesenheit auf eine Zersetzung zurückzuführen ist, denn die reinen, nicht ranzigen Fette bestehen hauptsächlich aus Tripalmitin, Tristearin und Triolein. Die freien und flüchtigen Fettsäuren sind als Product einer Spaltung der Triglyceride anzusehen, wobei sich Mono- und Diglyceride bilden. Die so frei gewordenen Fettsäuren und Glycerin werden durch den Sauerstoff der Luft oxydirt, und es entstehen kohlenstoffärmere, sauerstoffreichere Säuren. Nun ist aber das Fleischmehl ein nicht vollständig frisches Material, und das in ihm enthaltene Fett konnte eine Zersetzung erlitten haben, so dass wir uns kein richtiges Urtheil über die Zahlen in der Tab. II. bilden können, denn dieselben weichen von einander

ab, wir wissen also nicht, welche von ihnen die eigentlich richtigere ist. Wodurch können wir aber die Differenzen in den freien und flüchtigen Säuren erklären? Dass das Fett während der Extraction eine Zersetzung erleidet, wurde bereits in Bogdanow's Versuche konstatirt. Diese Thatsache führt zu der Annahme, dass das Lösungsmittel wahrscheinlich eine Wirkung auf die Intensität der Zersetzung ausübt. Um diese Frage zu entscheiden, habe ich einen Theil Fett von bekanntem Säuregehalt im Soxhlet'schen Apparate 7 Tage lang mit Aether und einen anderen Theil 10 Stunden mit Chloroform erwärmt, wobei der Chloroformextraction eine einstündige Auskochung mit Alkohol voranging. Die folgenden Zahlen sind bei der Analyse vor und nach dem Erwärmen gewonnen:

Tabelle III.

	Vor dem Erwärmen	Nach dem Erwärmen	
		mit Aether	mit Alkohol-Chloroform
Flüchtige Fettsäuren . . .	0,34 %	2,79 %	3,53 %
Freie Fettsäuren	11,6 %	13,57 %	14,82 %

Die Resultate zeigen, dass die freien und flüchtigen Fettsäuren durch das Erwärmen während der Extraction vermehrt werden, und zwar, je höher die Temperatur des Lösungsmittels ist, desto höher der Gehalt an freien und flüchtigen Fettsäuren, was auch aus den Zahlen der Tab. II klar zu sehen ist, nämlich: bei dem Rosenfeld'schen Verfahren, wo als Extractionsmittel Alkohol und Chloroform zur Anwendung gelangten, beobachten wir bedeutend höhere Säurezahlen, bei dem Soxhlet'schen, d. h. bei der Aetherextraction die niedrigsten. Nun ist aber die Voit'sche Zahl relativ geringer als die Soxhlet'sche, was meinen Ausführungen auf den ersten Blick widerspricht. Diese Thatsache lässt sich leicht erklären, wenn wir uns erinnern, dass Voit die Substanz mit Alkohol zusammenrührt und auf dem Wasserbade 15 Stunden stehen lässt, bis der Geruch nach Alkohol verschwunden ist; dabei verdampft selbstverständlich auch ein Theil der niedrig siedenden Säuren, sobald dieselben frei sind.

Die Thierfette bestehen aus den Glyceriden der Palmitin-, Stearin- und Oelsäure, und zwar sind nach Otto Hehners (19) Untersuchungen

in 100 Theilen Fett, mit Ausnahme von Butter, im Durchschnitt 95,5 Theile entsprechender Säuren enthalten. Nun ist es klar, dass die Untersuchung der vorliegenden Fette nach dieser Richtung hin von besonderer Bedeutung ist, weil uns dadurch die Möglichkeit geboten wird, einen Schluss über die Natur dieser Fette zu ziehen. Bei der Untersuchung fand ich es für zweckmässig nicht allein die Summe der in Wasser unlöslichen Säuren, sondern auch den Gehalt an Palmitin-, Stearin- und Oelsäure zu ermitteln.

Um möglichst genaue Resultate zu erhalten, habe ich die Oelsäure nach der in den Laboratorien vielfach angewendeten Hübl'schen Methode bestimmt, da bei der Trennung dieser drei Säuren Ungenauigkeiten nicht zu vermeiden sind. Der Hübl'schen Methode (20) liegt zu Grunde der Unterschied zwischen den gesättigten und ungesättigten Säuren in ihrem Verhalten gegen Haloide. Während die ersteren sich unter gewöhnlichen Verhältnissen gegen diese Körperclasse indifferent verhalten, addiren die letzteren zwei resp. vier Atome eines Haloides. Die Hübl'sche Jodzahl gibt an, wieviel Procente Jod ein Fett zu addiren vermag, und bildet demnach ein Maass für den Gehalt eines Fettes an ungesättigten Säuren. Da es sich im gegebenen Falle hauptsächlich um Oelsäure handelt, so können wir aus der Jodzahl den Oelsäuregehalt der Fette bestimmen. C. Liebermann (29) hat seiner Zeit die Hübl'sche Methode angegriffen. Er führt u. A. Folgendes aus: „Dass bei dieser Methode, welche darin besteht, die Fette oder Fettsäuren mit Jod bei Gegenwart von Quecksilberchloridlösung zu titriren und das verschwundene Jod zu messen, wirklich Jod an die ungesättigten Säuren angelagert werden müsse, erscheint theoretisch keineswegs nothwendig. Hübl selbst nimmt an, dass eine Addition von Chlorjod an die ungesättigten Säuren stattfindet, ohne indessen den Vorgang mit reinen Säuren irgendwie erschöpfend untersucht zu haben. Leicht denkbar wäre z. B. auch, dass das Reagens unter Bildung von Quecksilberjodid einfach Chor an die ungesättigten Säuren addirte. Quecksilberjodid erhält man auch thatsächlich oft in grossen Mengen, wenn man nach der Reaction die Lösung mit viel Wasser fällt und das abgeschiedene Chloroform abhebt und verdunstet, im Verdunstungsrückstand des letzteren. Wenn die Hübl'sche Methode sich wirklich praktisch so bewährt, wie gewöhnlich angegeben wird, so wäre es wohl an der Zeit, den Vorgang an reinen ungesättigten Säuren genauer aufzuklären.“ In C. Liebermann's Versuchen mit Elaidin-, Behenol-, Brassidin-,

Eruka-, Phenylpropiol- und Zimmtsäure zeigte es sich, dass, während Elaidin-, Brassidin- und Erukasäure das Reagens fast sofort entfärbten, von Behenol-, Zimmt-, Phenylpropiolsäure auch noch nicht der zehnte Theil des dem Jodgehalt nach erforderlichen Reagens selbst nach Stunden entfärbt wurde. In meinen Versuchen habe ich gut übereinstimmende Resultate erhalten, wobei ich die Beobachtung gemacht habe, dass die Reaction bei gutem Wetter gleichmässig und schnell verläuft, dagegen bei trübem sehr langsam, meistentheils aber gelingt sie gar nicht.

Jodzahl-Oelsäure.

Soxhlet.

Versuch I.

Angewandt 1,1238 g Fett.

Angewandte Jodlösung . . . . . 30,00 ccm
„ Natriumthiosulfat . . . . . 11,45 ccm
10 ccm Jodlösung entspr. 18,2 ccm $Na_2S_2O_3$
1 ccm Natriumthiosulfat = 0,0146 g Jod
10 ccm Jodlösung = 18,2 × 0,0146 = 0,26572 g
30 ccm „ = 0,79716 g Jod
11,45 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,16717 g „

verbraucht 0,62979 g Jod

1,1238 : 0,62979 = 100 : x $x = 56,0$
$J_2 : C_{18}H_{34}O_2 = 254 : 282 = 56 : y$. $y = 62,17\,\%$.

Versuch II.

Angewandt 1,1012 g Fett.

Angewandte Jodlösung . . . . . 30,00 ccm
„ Natriumthiosulfat . . . . . 11,25 ccm
10 ccm Jodlösung entspr. 17,9 $Na_2S_2O_3$
1 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,0144 g Jod
10 ccm Jodlösung = 17,9 × 0,0144 = 0,25776 g
30 ccm „ = 0,77328 g Jod
11,25 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,16200 g „

verbraucht 0,61128 g Jod

1,1012 : 0,61128 = 100 : x. $x = 55,5$
$J_2 : C_{18}H_{34}O_2 = 254 : 282 = 55,5 : y$. $y = 61,61\,\%$.

E. Voit.

Versuch I.

Angewandt 1,6580 g Fett.

Angewandte Jodlösung . . . . . 40,00 ccm
„ Natriumthiosulfat . . . . . 10,3 ccm

10 ccm Jodlösung entspr. 18,2 ccm $Na_2S_2O_3$
1 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,0146 g Jod
10 ccm Jodlösung = 18,2 × 0,0146 = 0,26572 g
40 ccm „ = 1,06288 g Jod
10,3 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,15038 g „

verbraucht 0,91250 g Jod.

1,658 : 0,91250 = 100 : x. x = 55
$J_2 : C_{18}H_{34}O_2$ = 254 : 282 = 55 : y. y = 61,06 %.

Versuch II.

Angewandt 1,0932 g Fett.

Angewandte Jodlösung . . . . . 30 ccm
„ Natriumthiosulfat . . . . . 12 ccm
10 ccm Jodlösung entspr. 17,9 ccm $Na_2S_2O_3$
10 ccm „ = 17,9 × 0,0144 = 0,25776 g
30 ccm „ = 0,77328 g Jod
12 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,17280

verbraucht 0,60048 g Jod

1,0932 : 0,60048 = 100 : x. x = 54,93.
$J_2 : C_{18}H_{34}O_2$ = 254 : 282 = 54,93 : y. y = 60,98 %.

Rosenfeld.

Versuch I.

Angewandt 1,4224 g Fett.

Angewandte Jodlösung. . . . . 35,0 ccm
„ Natriumthiosulfat . . . . . 11,2 ccm
10 ccm Jodlösung entspr. 18,2 ccm $Na_2S_2O_3$
1 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,0146 g Jod
10 ccm Jodlösung = 18,2 × 0,0146 = 0,26572 g Jod
35 ccm „ = 0,93002 g Jod
11,2 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,16352 g „

verbraucht 0,76650 g Jod

1,4224 : 0,76650 = 100 : x. x = 53,8.
$J_2 : C_{18}H_{34}O_2$ = 254 : 282 = 53,8 : y. y = 59,72 %.

Versuch II.

Angewandt 1,0082 g Fett.

Angewandte Jodlösung . . . . . 25,0 ccm
„ $Na_2S_2O_3$. . . . . 8,5 ccm
10 ccm Jodlösung entspr. 18,2 ccm $Na_2S_2O_3$
1 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,0146 g Jod
10 ccm Jodlösung = 18,2 × 0,0146 = 0,26572 g
25 ccm „ = 0,6643 g Jod
8,5 ccm $Na_2S_2O_3$ = 0,1241 g

verbraucht 0,5402 g Jod

1,0082 : 0,5402 = 100 : x. x = 53,58
$J_2 : C_{18}H_{34}O_2$ = 254 : 282 = 53,58 : y. y = 59,48 %.

Palmitin- und Stearinsäure (21).

10 Gewichtstheile Fett werden mit 30—40 Volumtheilen Weingeist und 4—6 Gewichtstheilen Kalihydrat, die man vorher in 20 Volumtheilen Wasser löst, in einem mit Rückflusskühler versehenen Kolben im Wasserbade eine Stunde zu schwachem Sieden erhitzt. Nach dem Verseifen des Fettes wird die gebildete Seife mittelst verdünnter Schwefelsäure zersetzt, das aufschwimmende Fettsäuregemenge in wenig heissem Alkohol gelöst und die beim Erkalten sich ausscheidende Masse gut abgepresst. Durch Wiederholung dieser Operation entfernt man die Oelsäure vollständig, und ein Gemenge von Palmitin- und Stearinsäure bleibt zurück. Das resultirende Gemenge wird der partiellen Fällung unterworfen. Die Fettsäuren werden in heissem Weingeist gelöst; dazu wird eine kochende weingeistige Lösung von essigsaurem Baryt hinzugefügt, $^2/_7$ des Gewichtes vom Säuregemenge. Der beim Erkalten abgeschiedene Niederschlag enthält hauptsächlich die Stearinsäure als Barytsalz. Aus dem Filtrate fällt man mit überschüssigem essigsaurem Baryt den Rest der Stearin- und alle Palmitinsäure aus. Aus diesem Salzgemisch erhält man durch Zerlegen mit heisser Salzsäure ein an Palmitinsäure sehr reiches Gemenge, das der fractionirten Fällung noch ein Mal unterworfen wird. Die resultirenden Säuren werden durch Umkrystallisiren gereinigt. Die Palmitinsäure schmilzt bei 62°, die Stearinsäure bei 69,2°.

Soxhlet:

Versuch I.

Angewandt 9,1368 g Fett.
Erhalten 2,8864 g Palmitin- + Stearinsäure
1,946 g = 21,3% Palmitinsäure
0,834 g = 9,13% Stearinsäure.

Versuch II.

Angewandt 9,4926 g Fett.
Erhalten 2,9770 g Palmitin- + Stearinsäure
1,9934 g = 21% Palmitinsäure
0,8734 g = 9,2% Stearinsäure.

E. Voit.

Versuch I.

Angewandt 9,116 g Fett.
Erhalten 2,9942 g Palmitin- + Stearinsäure
2,0156 g = 22,10% Palmitinsäure
0,8832 g = 9,69% Stearinsäure.

Versuch II.

Angewandte Substanz 9,7968 g Fett.
Erhalten 3,1848 g Palmitin- + Stearinsäure
2,1162 g = 21,6 % Palmitinsäure
0,960 g = 9,8 % Stearinsäure.

Rosenfeld:

Versuch I.

Angewandt 9,8266 g Fett.
Erhalten 3,0362 g Palmitin- + Stearinsäure
2,0542 g = 20,9 % Palmitinsäure
0,8770 g = 8,92 % Stearinsäure.

Versuch II.

Angewandt 9,5984 g Fett.
Erhalten 2,9812 g Palmitin- + Stearinsäure
2,0156 g = 21 % Palmitinsäure
0,8734 g = 9,1 % Stearinsäure.

Tabelle IV. In 100 g Fett.

	Oelsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure	Verseifbar
Soxhlet	61,89	21,15	9,16	92,20
E. Voit	61,02	21.85	9,74	92,61
Rosenfeld	59,60	20,9	9,0	89,50

Tabelle V. In 100 g Substanz.

	Oelsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure	Verseifbar
Soxhlet	8,04	2,74	1,19	11,97
E. Voit	7,39	2,63	1,18	11,20
Rosenfeld	10,64	3,73	1,60	15,97

Vergleichen wir die Zahlen der in Wasser unlöslichen Fettsäuren in 100 g Fett mit der von Hehner (19) für Rinderfett angegebenen = 95,5, so ergibt sich eine Differenz von 6,0 bei Rosenfeld, 2,89 bei Voit und 3,30 bei Soxhlet. Diese Differenzen verhalten sich fast wie die Differenzen der freien Fett-

säuren, was auch als Beweis dafür dienen kann, dass während der Extraction eine Zersetzung des Fettes stattfindet, wie ich bereits ausgeführt habe. Wir kommen zu denselben Resultaten, wenn wir die Zahlen der verseifbaren Säuren auf die ursprüngliche Substanz berechnen. Nun ist aber die Frage damit nicht beantwortet, denn die freien Fettsäuren bilden ein Gemisch von Säuren hohen und niederen Molekulargewichts, so dass die Zahlen, die wir erhalten haben, nur rein relative Schätzungswerthe sind, und in Folge dessen können sie nicht die Differenzen in den verseifbaren Säuren vollständig erklären.

Worauf können wir aber diese abweichenden Zahlen zurückführen? Wie bekannt, gehen in Lösung mit dem Fett während der Extraction auch Lecithin und andere Stickstoffverbindungen über. Da das Lecithin, dem Hoppe-Seyler (27) folgende Formel zuschreibt:

$$C_3H_5\begin{cases}(C_{18}H_{35}O_2)_2\\ OPO\begin{cases}OH\cdot N(CH_3)_3\\ O-C_2H_4-OH\end{cases}\end{cases}$$

eine oder zwei von diesen Fettsäuren enthält, so muss in einem lecithinhaltigen Fett der Gehalt an den verseifbaren Fettsäuren entsprechend der Menge Lecithin grösser sein. Um das Lecithin zu ermitteln, bestimmt man gewöhnlich den Phosphorgehalt, aus dem sich die Lecithinmenge berechnen lässt [Schulze und Frankfurt (22)]; indem man das dem Phosphor entsprechende Magnesiumpyrophosphat mit 7,27 multiplicirt, nach der Formel:

$$Mg_2P_2O_7 : 2\ C_{44}H_{90}PNO_3 = 222 : 1614 = x : y$$

$$y = \frac{1614\ x}{222} = 7{,}27\cdot x$$

oder den gefundenen Gehalt an Phosphorsäureanhydrid mit 11,366 multiplicirt, nach der Formel:

$$P_2O_5 : 2\ C_{44}H_{90}PNO_3 = 142 : 1614 = x : y$$

$$y = \frac{1614\ x}{142} = 11{,}366\cdot x$$

findet man den Gehalt an Lecithin. Zur Bestimmung des Phosphors in lecithinhaltigem Fett oxydirt man das Fett mit Kalihydrat und Salpeter, löst in Wasser und fällt mit Magnesiamischung.

Lecithin.

Soxhlet:

Versuch I.

Angewandt 1,0364 g Fett. Erhalten 0,0090 g Magnesiapyrophosphor.

$Mg_2P_2O_7 : P_2 = 222 : 62 = 0{,}0090 : x.$

$x = 0{,}002513$ g Phosphor.

$1{,}0364 : 002513 = 100 : x.$

$x = 0{,}24\,\%.$

$0{,}009 \times 7{,}27 = 0{,}06543$ g.

$1{,}0364 : 0{,}06543 = 100 : y.$

$y = 6{,}31\,\%.$

Versuch II.

Angewandt 0,9846 g Fett. Erhalten 0,0086 g Magnesiumpyrophosphor.

$Mg_2P_2O_7 : P_2 = 222 : 62 = 0{,}0086 : x.$

$x = 0{,}002401$ g Phosphor.

$0{,}9846 : 0{,}002401 = 100 : x.$

$x = 0{,}24\,\%.$

$0{,}0086 \times 7{,}27 = 0{,}062522$ g.

$0{,}9846 : 0{,}062522 = 100 : y.$

$y = 6{,}34\,\%.$

E. Voit.

Versuch I.

Angewandt 0,9246 g Fett. Erhalten 0,0126 g Magnesiapyrophosphor.

$Mg_2P_2O_7 : P_2 = 222 : 62 = 0{,}0126 : x.$

$x = 0{,}003519$ g Phosphor.

$0{,}9246 : 0{,}003519 = 100 : x.$

$x = 0{,}38\,\%.$

Lecithin: $0{,}0126 \times 7{,}27 = 0{,}091602$ g.

$0{,}9246 : 0{,}091602 = 100 : y.$

$y = 9{,}89\,\%.$

Versuch II.

Angewandt 0,8652 g Fett. Erhalten 0,010 g Magnesiapyrophosphor.

$222 : 62 = 0{,}010 : x.$

$x = 0{,}002793$ g Phosphor.

$0{,}8652 : 0{,}002793 = 100 : x.$

$x = 0{,}32\,\%.$

Lecithin: $0{,}010 \times 7{,}27 = 0{,}0727$ g.

$0{,}8652 : 0{,}0727 = 100 : y.$

$y = 8{,}4\,\%.$

Rosenfeld:

Versuch I.

Angewandt 1,4448 g Fett. Erhalten 0,0310 g Magnesiapyrophosphor.

$222 \quad 62 = 0{,}0310 : x.$

$x = 0{,}008658$ g Phosphor.

$1{,}4448 : 0{,}008658 = 100 : x.$

$x = 0{,}59\,\%.$

Lecithin: $0{,}0310 \times 7{,}27 = 0{,}22537$ g.

$1{,}4448 : 0{,}22537 = 100 : y.$

$y = 15{,}5\,\%,$

Versuch II.

Angewandt 1,0682 g Fett. Erhalten 0,0246 g Magnesiumpyrophosphor.

$222 : 62 = 0{,}0246 : x.$

$x = 0{,}00687$ g Phosphor.

$1{,}0682 : 0{,}00687 = 100 : x$

$x = 0{,}64\,\%.$

Lecithin: $0{,}0246 \times 7{,}27 = 0{,}178842$ g.

$1{,}0682 : 0{,}178842 = 100 : y.$

$y = 16{,}74\,\%.$

Stickstoff.

Zur Bestimmung des im Lecithin und anderen Verbindungen enthaltenen Stickstoffs wird das Fett mit concentrirter Schwefelsäure und Quecksilberoxyd oxydirt und wie gewöhnlich nach Kjeldahl verfahren.

Soxhlet.

Versuch I.

Angewandt 1,1068 g Fett. Verbraucht 1,6 ccm Schwefelsäure.

$1{,}6 \times 0{,}00294 = 0{,}004704$ N.

$1{,}1068 : 0{,}004704 = 100 : x.$

$x = 0{,}425\,\%.$

Versuch II.

Angewandt 1,0824 g Fett. Verbraucht 1,55 ccm Schwefelsäure.

$1{,}55 \times 0{,}00294 = 0{,}004557$ N.

$1{,}0824 : 0{,}004557 = 100 : x.$

$x = 0{,}42\,\%.$

E. Voit:

Versuch I.

Angewandt 1,3216 g Fett. Verbraucht 2 ccm Schwefelsäure.

$2 \times 0{,}09294 = 0{,}00588$ N.

$1{,}3216 : 0{,}00588 = 100 : x.$

$x = 0{,}45\,\%.$

Versuch II.

Angewandt 1,1788 g Fett. Verbraucht 1,85 ccm Schwefelsäure.

$1{,}85 \times 0{,}00294 = 0{,}005439$ N.

$1{,}1788 : 0{,}005439 = 100 : x.$

$x = 0{,}46\,\%.$

Rosenfeld:

Versuch I.

Angewandt 1,0390 g Fett. Verbraucht 3,18 ccm Schwefelsäure.

$0{,}00294 \times 3{,}18 = 0{,}009349$ N.

$1{,}0390 : 0{,}009349 = 100 : x.$

$x = 0{,}89\,\%.$

Versuch II.

Angewandt 1,1274 g Fett. Verbraucht 3,5 ccm Schwefelsäure.

$0{,}00294 \times 3{,}5 = 0{,}010290$ N.

$1{,}1274 : 0{,}010290 = 100 : x.$

$x = 0{,}90\,\%.$

Tabelle VI. In 100 g Fett.

	Phosphor	Lecithin	Palmitinsäure im Lecithin enthalten	Stickstoff	Stickstoff i. Lecithin enthalten	Stickstoff in anderen Verbindungen
Soxhlet	0,24	6,32	3,99	0,425	0,108	0,31
E. Voit	0,35	9,15	5,78	0,46	0,15	0,31
Rosenfeld	0,62	16,12	10,18	0,89	0,28	0,61

Tabelle VII. In 100 g Substanz.

	Phosphor	Lecithin	Palmitinsäure im Lecithin enthalten	Stickstoff	Stickstoff i. Lecithin enthalten	Stickstoff in anderen Verbindungen
Soxhlet	0,031	0,82	0,51	0,055	0,014	0,04
E. Voit	0,042	1,10	0,7	0,055	0,018	0,037
Rosenfeld	0,11	2,88	1,83	0,159	0,05	0,109

Das Lecithin habe ich als palmitinsaures berechnet, womit ich keinen besonderen Fehler begangen zu haben glaube, da die Molekulargewichte der Palmitin-, Stearin- und Oelsäure nicht viel unter einander differiren.

Aus diesen Tabellen ist ersichtlich, dass das Rosenfeld'sche Fett den höheren, das Soxhlet'sche den geringeren Lecithingehalt aufweist. Vergleichen wir den Gehalt an Palmitinsäure im Fett in der Tab. IV mit der im Lecithin enthaltenen Menge Palmitinsäure, so finden wir, dass sich die Zahlen proportional verhalten; die Differenzen im Palmitinsäuregehalt lassen sich also durch das Lecithin erklären. Angenommen, dass das Lecithin Palmitin- und Stearinsäure enthält, so sehen wir, dass die Zahlen auch in diesem Falle fast übereinstimmen. Da das Lecithin bei einer genauen Bestimmung nicht als Fett betrachtet werden kann, so ist demnach seine Anwesenheit als eine Beimengung anzusehen.

Nun bleibt noch zu sehen, wie sich der Stickstoffgehalt verhält. Auch in diesem Falle beobachten wir in den Zahlen einen grossen Unterschied, der für die Lösung unserer Frage von besonderer, entscheidender Wichtigkeit ist, denn der Stickstoffgehalt deutet auf die Anwesenheit fremder Körper hin, die auf keine Weise als Fett mitgerechnet werden können. Die letzte Columne dieser Tabellen zeigt den Stickstoffgehalt auf fremde, nicht fettartige Körper bezogen und wirft einiges Licht auf den Mehrgehalt an Fett nach der Rosenfeld'schen Methode. In der That, sehen wir uns in der Tab. I den Procentgehalt an Fett an und vergleichen ihn mit dem Stickstoffgehalt, so finden wir, dass dem höheren Fettgehalt ein höherer Stickstoffgehalt entspricht. Auf solche Weise kommen wir zu dem Schluss, dass sich die Differenzen in der Menge nach diesen Methoden gewonnenen Fettes auf die Verunreinigungen beziehen, dass diese Verunreinigungen aus Lecithin und anderen, unbekannten Stickstoffverbindungen bestehen.

Es ist auch von Interesse, zu wissen, welcher Natur diese Stickstoffverbindungen sind. Das von mir untersuchte Fett wurde aus Fleischmehl gewonnen, das eventuell eine Zersetzung erleiden konnte; es kann also Fäulnissproducte der Eiweisskörper, aber nicht die Eiweisskörper selbst enthalten, da die letzteren in Aether und Alkohol unlöslich sind; die Eiweissreactionen (Millon's Reagens, Xanthoproteïn-, Biuretreaction u. A. [23]) haben alle negative Resultate gegeben. Durch die in Folge bakterieller Einwirkung hervorgerufene Fäulniss entstehen aus den Eiweissstoffen ausser Fettsäuren und anderen auch basische Verbindungen, meist Diamine und Imine der Fettreihe, die den pflanzlichen Basen, den Alkaloïden, nahe stehen und Ptomaïne und Toxine genannt werden, wie z. B. Cadaverin, Putrescin, Neurin und andere. Letzteres bildet sich aus dem Lecithin, das bereits im

ersten Stadium der Fäulniss in Fettsäuren, Glycerinphosphorsäure und Cholin zerfällt. Das Cholin findet sich nach Brieger in den von dem eigentlichen Zersetzungsvorgange oft noch gar nicht betroffenen Organen einzig und allein von allen basischen Stoffen, so dass es fraglich bleibt, ob der Zerfall der Lecithine auf die Thätigkeit der Bakterien zurückzuführen ist. Brieger nimmt an, dass die Lecithine sich in ihre Componenten auflösen, in Folge der schon unmittelbar nach dem Tode sich geltend machenden energischen Reductionsfähigkeit der Gewebe. Aus dem Cholin bildet sich bei der Fäulniss auch ein Oxydationsproduct, das von Brieger Muskarin genannt wird, da es sowohl in seiner elementaren Zusammensetzung als auch in seinen toxischen Wirkungen dieser pflanzlichen Base gleicht. In früherer oder späterer Periode der Fäulniss tritt ein physiologisch indifferentes Diamin auf, $C_5H_{14}N_2$, das dem Cadaverin isomer ist und von Brieger als Neuridin bezeichnet wird. Die letzten drei Basen verschwinden in der späteren Fäulnisperiode, und man findet oft neben dem Cadaverin und Putrescin auch Saprin, eine ungiftige Diaminbase von unbekannter Constitution. Es entstehen noch mehrere giftige und ungiftige basische Verbindungen, sowohl in Folge der bakteriellen Einwirkung als auch durch einfache chemische Processe (24).

Um die Ptomaïne nachzuweisen (25), wird das Fett mit salzsäurehaltigem Wasser ausgezogen, filtrirt und das Filtrat mit einer frisch bereiteten concentrirten Gerbsäurelösung versetzt. Es entstand zuerst eine Trübung und nach $^1/_2$ Stunde ein weisslicher Niederschlag. Eine zweite Probe wurde mit Phosphormolybdänsäure versetzt; es bildete sich ebenfalls ein weisslicher Niederschlag. Quantitativ werden die Ptomaïne nach der Methode von Uslar und Erdmann (26) bestimmt. Dieselbe beruht darauf, dass man viele Alkaloide aus alkalischen Lösungen mit Amylalkohol ausschütteln und nach dem Verdunsten des Amylalkohols gewinnen kann. Die Ptomaïne werden vom Amylalkohol in reichlicher Menge gelöst. Die Ptomaïne werden, wie bei der qualitativen Prüfung, aus dem Fett mit heissem salzsäurehaltigem Wasser ausgezogen, filtrirt, die Lösung mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Amylalkohol ausgeschüttelt.

5,7436 g Fett (nach Rosenfeld'scher Methode) gaben 0,01608 g, was 0,28 % ausmacht.

Angenommen, dass die im Fett enthaltenen Stickstoffverbindungen aus Cholin und Cadaverin bestehen, so können wir den Stickstoff-

gehalt auf dieselben, d. h. deren mittleres Molekulargewicht, umrechnen:

$$\frac{C_5H_{14}N_2 + C_5H_{15}NO_2}{2} : \frac{3\ N}{2} = 126 : 21 = x : y$$

wir erhalten demnach:

Tabelle VIII.

	Stickstoff	In 100 g Fett	In 100 g Substanz
		Cholin + Cadaverin	
Soxhlet.	0,31	1,86	0,24
E. Voit	0,31	1,86	0,225
Rosenfeld	0,61	3,66	0,654

Ziehen wir nun von der Menge Fett den Gehalt an Lecithin und Stickstoffverbindungen ab, so ergeben sich folgende Resultate:

Soxhlet: 13 — (0,82 + 0,24) = 11,94 %,
E. Voit: 12,11 — (1,10 + 0,225) = 10,788 %,
Rosenfeld: 17,87 — (2,88 + 0,654) = 14,336 %.

Die Resultate führen zu folgenden Schlussfolgerungen:

Die Rosenfeld'sche Methode, die die höchste Procentzahl Extract liefert, ist bedenklich wegen des hohen Gehaltes des Extractes an stickstoffhaltigen Beimengungen, deren Natur nicht näher bekannt ist. Sie bietet dagegen Vorzüge, wenn es sich auch um die Bestimmung des Gesammtgehaltes an Lecithin handelt.

Nach dem Voit'schen Verfahren erhalten wir die geringste Menge Fett und relativ mehr Beimengungen als durch die gewöhnliche Aetherextraction; die Extractionsdauer von 24 Stunden ist ungenügend.

Durch das Wiederauflösen des Extractes in Aether oder Petroleumäther werden nicht ausschliesslich fettartige Substanzen erhalten, so dass man solches Fett nicht als Reinfett betrachten kann.

Das Fett nach der Dormeyer'schen Methode konnte ich wegen der durch die Verdauung gewinnbaren allzu geringen Extractmengen nicht näher untersuchen.

Generaltabelle.

Tabelle IX. In 100 g Fett.

	Freie Fett-säuren	Flücht. Fett-säuren	Oel-säure	Palmi-tinsäure	Stearin-säure	Verseif-bare Säuren	Phos-phor
Soxhlet . . .	14,67	0,34	61,89	21,5	9,16	92,20	0,24
E. Voit	11,6	0,34	61,02	21,85	9,74	92,61	0,35
Rosenfeld . .	16,2	1,08	59,60	20,9	9,0	89,50	0,62

	Lecithin	Palmitin-säure im Lecithin	Stick-stoff	Stickstoff im Lecithin	Stickstoff in anderen Ver-bindungen	Ptomaïne
Soxhlet . . .	6,32	3,99	0,425	0,108	0,31	1,86
E. Voit	9,15	5,78	0,46	0,15	0,31	1,86
Rosenfeld . .	16,12	10,18	0,89	0,28	0,61	3,66

Tabelle X. In 100 g Substanz.

	Fett-menge	Freie Fett-säuren	Flücht. Fett-säuren	Oel-säure	Palmi-tinsäure	Stearin-säure	Verseif-bare Säuren
Soxhlet . . .	13,0	1,90	0,04	8,04	2,74	1,19	11,98
E. Voit	12,11	1,40	0,04	7,39	2,63	1,18	11,2
Rosenfeld . .	17,87	2,89	0,19	10,64	3,73	1,6	15,97

	Phos-phor	Lecithin	Palmi-tinsäure im Lecithin	Stick-stoff	Stick-stoff im Lecithin	Pto-maïne	Reinfett
Soxhlet . . .	0,031	0,82	0,51	0,055	0,014	0,24	11,94
E. Voit	0,042	1,10	0,7	0,055	0,018	0,225	10,78
Rosenfeld . .	0,11	2,88	1,83	0,159	0,05	0,654	14,33

B. Eine neue Methode der quantitativen Fettbestimmung.

Nach der Voit'schen und Rosenfeld'schen Methode wird der gewonnene Extract in Petroleumäther gelöst, um ihn von den Beimengungen zu befreien. Als eigentliches Extractionsmittel wurde

der Petroleumäther bis jetzt wenig verwendet. Schlesinger hat unlängst einen Controlversuch angestellt, der nicht zu Gunsten des Petroleumäthers ausfiel; er erhielt durch Extrahiren mit Petroleumäther weniger Fett als mit gewöhnlichem Aether. Diese Resultate scheinen mir ein wenig auffallend. Nun gibt aber Schlesinger nicht an, was für Petroleumäther in seinen Versuchen zur Anwendung gelangte. Der käufliche Petroleumäther ist ein Gemisch von verschieden hoch siedenden Fractionen bis 120°, so dass die Temperatur des Wasserbades nicht hoch genug ist, um alle Fractionen zum Sieden zu bringen. Auf solche Weise destillirt im Extractionsapparate nur ein Theil des angewendeten Petroleumäthers, was die Analyse ohne Zweifel beeinträchtigt. Um mich aber zu überführen, habe ich einige Fettbestimmungen in demselben Ausgangsmaterial (Fleischmehl) ausgeführt, das ich für meine Untersuchungen gebraucht habe, um einen Vergleich anstellen zu können. Als Extractionsmittel gelangte die bei 50 bis 60° siedende Fraction Petroleumäther zur Anwendung. Ich erhielt folgende Resultate:

Versuch I.

Angewandte Substanz 9,4352 g.

24 stünd. Extr.	1,386 g	Fett =	14,68 %
12 „ „	0,0438 g	„ =	0,46 %
12 „ „	0,0058 g	„ =	0,06 %
48 Stunden	1,4356 g		15,20 %.

Versuch II.

Angewandte Substanz 8,5072 g.

24 stünd. Extr.	1,2642 g	Fett =	14,86 %
12 „ „	0,0400 g	„ =	0,47 %
12 „ „	0,0050 g	„ =	0,059 %
48 Stunden	1,3092 g		15,389 %.

Versuch III.

Angewandte Substanz 8,7252 g.

24 stünd. Extr.	1,2442 g	Fett =	14,72 %
12 „ „	0,0568 g	„ =	0,65 %
12 „ „	0,0032 g	„ =	0,04 %
48 Stunden	1,3042 g		15,41 %.

Versuch IV.

Angewandte Substanz 7,6512 g.

24 stünd. Extr.	1,1546 g	Fett =	15,09 %
12 „ „	0,0162 g	„ =	0,21 %
12 „ „	0,0056 g	„ =	0,073 %
48 Stunden	1,1764 g		15,373 %.

Der Extract wurde filtrirt, der Petroleumäther verdunstet, dann gewogen und noch ein Mal in Petroleumäther gelöst, um ihn von etwaigen Beimengungen zu befreien, — es blieb aber kein Rückstand.

In den folgenden Versuchen wurde anfangs dieselbe Extractionsdauer eingehalten wie beim Extrahiren mit Aethyläther, um einen Vergleich anstellen zu können.

Versuch V.

Angewandte Substanz 13,7252 g.

12 stünd. Extr.	1,9848 g	Fett =	14,5 %
24 „ „	0,1124 g	„ =	0,82 %
12 „ „	0,0084 g	„ =	0,06 %
48 Stunden	2,1056 g		15,38 %.

Versuch VI.

Angewandte Substanz 8,6492 g.

12 stünd. Extr.	1,2646 g	Fett =	14,62 %
24 „ „	0,0468 g	„ =	0,54 %
12 „ „	0,0064 g	„ =	0,074 %.
48 Stunden	1,3178 g		15,234 %.

Der Extract löst sich ohne Rückstand in Aethyläther, Petroleumäther und Chloroform.

Diese Zahlen im Vergleich mit den Zahlen in der Tab. I zeigen, dass man durch Extrahiren mit Petroläther zu höherem Werthe gelangt als nach allen übrigen, mit Ausnahme der Rosenfeld'schen Methode. Was die Beschaffenheit dieses Extractes betrifft, so muss sie qualitativ dieselbe sein wie in allen übrigen. Es kann sich hier nur um die Menge der Verunreinigungen handeln, d. h. um einen höheren oder geringeren Phosphor- und Stickstoffgehalt. Die von mir zu diesem Zwecke ausgeführten Analysen gaben folgende Resultate:

Stickstoff.

Versuch I.

Angewandte Substanz 0,9142 g. Verbraucht 1 ccm Schwefelsäure.

1 ccm H_2SO_4 = 0,00294 N.

$0{,}9142 : 0{,}00294 = 100 : x.$

$x = 0{,}32\,\%.$

Versuch II.

Angewandte Substanz 0,9542 g. Verbraucht 0,95 ccm Schwefelsäure.

$0{,}00294 \times 0{,}95 = 0{,}00279$ N.

$0{,}9542 : 0{,}00279 = 100 : x.$

$x = 0{,}29\,\%.$

Phosphor.

Der Phosphorgehalt wurde maassanalytisch nach Neumann's (28) Verfahren bestimmt.

Angewandt 0,9964 g Fett. Verbraucht 7,2 ccm Natronlauge.

$7{,}2 \times 1{,}268 = 0{,}00913$ g P_2O_5.

$P_2O_5 : P_2 = 142 : 62 = 0{,}00913 : x$.

$x = 0{,}00398$ g Phosphor.

$0{,}9964 : 0{,}00398 = 100 : x$.

$x = 0{,}39\,\%$.

Lecithin: $0{,}00913 \times 11{,}366 = 0{,}10377$ g.

$0{,}9964 : 0{,}10377 = 100 : y$.

$y = 10{,}41\,\%$.

Tabelle XI.

	In 100 g Fett			In 100 g Substanz		
	Menge	Im Lecithin	In and. Verbind.	Menge	Im Lecithin	In and. Verbind.
Stickstoff	0,30	0,176	0,124	0,046	0,026	0,019

Diese Resultate, verglichen mit denen nach Soxhlet (Tab. IX und X), zeigen an Phosphor einen höheren Gehalt, nach Rosenfeld einen geringeren; dafür ist der Gehalt an Stickstoff in unbekannten Verbindungen, im Vergleich zu allen übrigen, ein bedeutend geringerer; wir erhalten also ein relativ reineres Fett.

Wie wir gesehen haben, wird Lösung des Extrakts in Petroleumäther empfohlen, um nur reine, fettartige Substanzen zu erhalten. Meine Untersuchungen haben aber bewiesen, dass der Petroleumäther als Reinigungsmittel nicht sein Ziel erreicht. Nun beschäftigte mich der Gedanke, ob man wenigstens eine bekannte Beimengung aus dem Fette vollständig entfernen kann, nämlich das Lecithin, den beständigen Begleiter des Fettes, der sich freilich in den Fettbestimmungen so eingebürgert hat, dass man ihn nicht mehr als Beimengung betrachtet.

Als Reinigungsmittel habe ich Aceton gewählt, in dem, wie bekannt, das Lecithin vollständig unlöslich ist, und das als Fällungsmittel für Lecithin (27) dient. Es ist uns auf solche Weise die Möglichkeit geboten, ein lecithinfreies Fett zu erhalten. Das Fett wird entweder direct in Aceton gelöst und vom Rückstand abfiltrirt, oder es wird zuerst in wenig Chloroform gelöst und dann mit Aceton gefällt.

1,308 g Petroleumätherextract in Aceton gelöst hat an Gewicht 0,1378 g verloren, was 10,54 % Lecithin ausmacht. Die Differenz von 0,13 %, verglichen mit dem aus der Phosphorbestimmung berechneten Lecithingehalt, fällt in die Fehlergrenzen, um so mehr, wenn man an die Unsicherheit des Molekulargewichts des Lecithins denkt (Palmitin-, Stearin- oder Oelsäure?). Denselben Versuch habe ich mit dem Rosenfeld'schen Fett angestellt: 1,8848 g Fett haben an Gewicht 0,3280 g verloren, was 17,4 % ausmacht. Vergleichen wir diese Zahl mit der aus der Phosphorbestimmung berechneten Menge Lecithin, so finden wir eine Differenz von 1,2 %, die auf Verluste nicht zurückgeführt werden kann. Wahrscheinlich sind im Rosenfeld'schen Fett ausser Lecithin noch andere in Aceton unlösliche Verbindungen enthalten. Die qualitative Prüfung des in Aceton löslichen Fettes gab keine Phosphorsäurereaction. Wenn wir nun von der Gesammtmenge Stickstoff im Petrolätherextract den Stickstoffgehalt im Lecithin abziehen, so erhalten wir ein Fett mit einem Stickstoffgehalt von nur 0,12 %, d. h. ein nahezu reines Fett. Die Stickstoffbestimmungen in dem acetonlöslichen Petroleumätherextract gaben folgende Resultate:

Versuch I.

Angewandt 0,9196 g Fett. Verbraucht 0,35 ccm Schwefelsäure.

1 ccm H_2SO_4 = 0,00294 N.

$0{,}35 \times 0{,}00294 = 0{,}001029$ N.

$0{,}001029 : 0{,}9196 = 100 : x.$

$$x = 0{,}11\,\%.$$

Versuch II.

Angewandt 0,9090 g Fett. Verbraucht 0,3 ccm Schwefelsäure.

$0{,}3 \times 0{,}00294 = 0{,}000882$ N.

$0{,}9090 : 0{,}000882 = 100 : x.$

$$x = 0{,}097\,\%.$$

Wenn wir den Stickstoffgehalt auf Ptomaïne umrechnen und vom Petrolätherextract den Lecithingehalt und Ptomaïngehalt abziehen, so finden wir im Vergleich mit dem Rosenfeld'schen Fett nur eine sehr geringe Differenz von 0,22 %:

$$\frac{C_5H_{14}N_2 + C_5H_{15}NO_2}{2} : \frac{3\,N}{2} = x : y$$

$$126 : 21 = x : 0{,}124$$

In 100 g Fett . . . . . $x = 0{,}744$.
In 100 g Substanz . . . . . $= 0{,}114$.
Lecithin in 100 g Substanz . . . . 1,10.
Mittelwerth des Petrolätherextractes . 15,33.
$15{,}33 - (1{,}10 + 0{,}114) = 14{,}116$
Rosenfeld . . . . . 14,336.

Das Ergebniss dieser Versuche führt zu dem Schluss, dass dieser Methode wie in qualitativer so auch in quantitativer Beziehung der Vorzug gegeben werden muss. Auch vom ökonomischen Standpunkte bewährt sich diese Methode in vorzüglicher Weise, da der Petroläther im Vergleich mit Aethyläther und Chloroform bedeutend billiger und auch nicht so flüchtig ist. Für ein Laboratorium, wo viel Fettbestimmungen ausgeführt werden, ist das durchaus nicht zu unterschätzen.

Der experimentelle Theil der vorliegenden Arbeit wurde im thierphysiologischen Institut der Königlichen landwirthschaftlichen Hochschule zu Berlin im October 1900 begonnen und im Juli 1901 zu Ende geführt.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. N. Zuntz, für die gütige Anregung und das wohlwollende Interesse, das er dieser Arbeit schenkte, meinen ehrerbietigsten Dank auszusprechen. Es ist mir angenehme Pflicht, dem verstorbenen Herrn Professor Dr. Frentzel für die freundliche Unterstützung und werthvollen Rathschläge, durch die er meine Arbeit förderte, besonderen Dank auszusprechen.

Literaturverzeichniss.

1) P. Argutinsky, Die elementare Zusammensetzung des Ochsenfleisches. Pflüger's Archiv Bd. 55.
2) E. Bogdanow, Ueber die Fette des Fleisches. Pflüger's Archiv Bd. 65.
3) Erwin Voit, Ein Beitrag zur Methode der Fettbestimmung. Zeitschr. für Biologie Bd. 35.
4) E. Pflüger, Ueber die Entstehung von Fett aus Eiweiss im Körper der Thiere. Pflüger's Archiv Bd. 51.
5) F. Soxhlet, Gewichtsanal. Bestimmung des Milchfettes. Dingler's polyt. Journal Bd. 232.

6) C. Dormeyer, Die quantitative Bestimmung von Fetten, Seifen und Fettsäuren in thierischen Organen. Pflüger's Archiv Bd. 65.
7) Athanasiu, Die Erzeugung von Fett im thierischen Körper unter dem Einfluss von Phosphor. Pflüger's Archiv Bd. 64.
8) J. Nerking, Neue Beiträge zur Fettbestimmung in thierischen Geweben und Flüssigkeiten. Pflüger's Archiv Bd. 73.
9) M. Schlesinger, Zur Kritik der Fettbestimmungsmethoden. Dissertation.
10) Liebermann und Szekely, Eine neue Methode der Fettbestimmung in Futtermitteln, Fleisch u. s. w. Pflüger's Archiv Bd. 72.
11) E. Bogdanow, Eine neue Methode der Fettbestimmung in thierischen Substanzen. Pflüger's Archiv Bd. 68.
12) Noel-Paton, Ueber die Beziehung der Leber zu den Fetten. Jahrb. über d. Fortschr. d. Thierchem. Bd. 26.
13) Otto Frank, Eine Methode, Fleisch von Fett zu befreien. Zeitschr. für Biologie Bd. 32.
14) Rosenfeld, Zur Methodik der Fettbestimmung. Centralblatt für innere Medicin Nr. 33.
15) Benedikt, Analyse der Fette und Wachsarten.
16) Merz, Zeitschr. für anal. Chemie Bd. 17 S. 390.
17) Haussmann, Dingler's polyt. Journal Bd. 240 S. 62.
18) E. Reichert, Vereinfachte Butterprüfung nach Hehner's Princip. Zeitschrift für anal. Chemie Bd. 18. — E. Meissl, Untersuchungen über die Verfälschung des käuflichen Butterschmalzes. Dingler's polyt. Journal Bd. 233. — R. Wollny, Ueber die Reichert-Meissl'sche Butterprüfungsmethode. Milchzeitung Bremen Jahrg. 16 Nr. 32.
19) O. Hehner, Die Analyse des Butterfettes. Zeitschr. für anal. Chemie. Bd. 16.
20) Hübl, Eine allgemein anwendbare Methode zur Untersuchung der Fette. Dingler's polyt. Journal. Bd. 253.
21) Heintz, Anal. Chem. Pharm. S. 84 und 88.
22) Schulze u. Frankfurt, Landw. Versuchsstation. Bd. 43, S.307. 1893.
23) Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie.
24) Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie.
25) Robert Otto, Ausmittelung der Gifte.
26) R. Kobert, Compend. der prakt. Toxicologie.
27) Hoppe-Seyler, Handbuch der physiol. und pathol. chem. Analyse.
28) Neumann, Phosphorbestimmung. Verhandlungen der phys. Gesellschaft. Sitzung vom 10. Novbr. 1899.
29) C. Liebermann u. H. Sachse, Ueber Phenylpropiolsäuredijodid und die Jodaddition an ungesättigte Säuren. Ber. Bd. 24, H. 2, S. 4112—4118.

Thesen.

1. Die Güte einer Fettextractions-Methode wird nicht durch die Menge des gewonnenen Extractes bedingt.
2. Der Berthelot'sche Satz, nach dem die chemischen Umsetzungen im Sinne der grössten Wärmeentwickelung verlaufen, ist nicht von allgemeiner Gültigkeit.
3. Den zum Aufbau der Eiweisskörper nöthigen Stickstoff nehmen die Pflanzen vermittels der Wurzel aus dem Boden auf.

Lebenslauf.

Am 17. Februar 1869 a. St. wurde ich, Wladimir Wolf Glikin, zu Kamenetz-Podolsky in Russland als Sohn des Lehrers Messel Glikin und seiner Gattin Ziwia, geb. Ochsmann, geboren. Ich bin mosaischer Confession. Meine wissenschaftliche Vorbildung erhielt ich auf dem Gymnasium zu Kamenetz-Podolsky, das ich mit dem Abgangszeugniss der 7. Klasse verliess, und widmete mich der Pharmacie. Am 27. Februar 1891 bestand ich das erste Examen an der Universität zu Kieff. Mein Studium musste ich dann Familienverhältnisse wegen auf längere Zeit unterbrechen, und erst im Jahre 1895 war es mir möglich, dasselbe wieder aufzunehmen. Im Herbst 1895 wurde ich an der Universität zu Berlin immatriculirt, wo ich Naturwissenschaften und insbesondere Chemie studirte. Die Promotionsprüfung bestand ich am 15. December 1902.

Ich besuchte die Vorlesungen und praktischen Uebungen folgender Professoren und Docenten: Bezold, Dilthey, Dessoir, Engler, E. Fischer, Frentzel †, Gabriel, Geiger, Liebreich, Liebermann, Pinner, Paulsen, Palzow, Rosenheim, Reissert, Simmel, Schmekel, Schmoller, Van t'Hoff, Voigt, N. Zuntz, Witt.

Allen diesen Herren, die sich um meine wissenschaftliche Ausbildung die grössten Verdienste erworben haben, werde ich mich stets zu Dank verpflichtet fühlen.

W. Glikin.

Glikin, Wladi
Berlin, 1903