Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 30 (1939)

Heft: 4-5

Artikel: Die Bestimmung des Gesamtkreatinins, speziell auch bei geringen Gehalten

Autor: Fellenberg, Th. von / Werder, J.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982512

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 05.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Die Bestimmung des Gesamtkreatinins, speziell auch bei geringen Gehalten.

Von Dr. Th. von FELLENBERG.
(Aus dem Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes, Vorstand: Prof. Dr. J. Werder.)

Das Schweizerische Lebensmittelbuch enthält zwei Methoden der Gesamt-Kreatininbestimmung. Die eine Methode, die für Fleischextrakt empfohlen wird, ist als Mehode nach *Folin-Geret* bezeichnet. Es werden 10 cm³ 2%iger Fleischextraktlösung in einer Porzellanschale mit 5 cm³ konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbad in einer Porzellanschale eingedampft, um das Kreatin in das um 1 H_2O ärmere Kreatinin überzuführen, wonach der Rückstand in geeigneter Weise mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung in Reaktion gebracht und die entstandene Rotfärbung nach bestimmter Vorschrift kolorimetriert wird.

Die zweite Methode ist diejenige von *Sudendorf* und *Lahrmann*[1]). Sie wird für Bouillonwürfel empfohlen. Man dampft 10—20 cm³ einer 10%igen Lösung mit 10 cm³ n-Salzsäure während 2 Stunden auf dem Wasserbad ein. Der Rückstand wird neutralisiert und einer Oxydation mit kochsalzhaltiger Permanganatlösung unterworfen. Im übrigen fährt man ähnlich fort wie nach der ersten Methode, allerdings unter Verwendung einer grössern Pikrinsäuremenge.

Die beiden Methoden unterscheiden sich vor allem durch den Säurezusatz. Das Reaktionsgemisch ist im ersten Fall 4,03, im zweiten 0,33 bis 0,5 normal.

Es sei noch bemerkt, dass die 3. Auflage unseres Lebensmittelbuches als Methode *Folin-Geret* ein Verfahren angibt, nach welchem 0,25—1,5 g Fleischextrakt direkt ohne vorherige Auflösung mit 5 cm³ konzentrierter Salzsäure versetzt und diese auf dem Wasserbad abgedampft wird.

Es war mir nicht möglich, nach der Literatur festzustellen, woher eigentlich die Verwendung der konzentrierten Säure stammt, jedenfalls dürfte sie weder von *Folin* noch von *Geret* herrühren. *Folin*[2]) war der erste, welcher die *Jaffé*'sche Kreatininreaktion zur quantitativen Bestimmung von Kreatin und Kreatinin, und zwar im Harn benutzte. Er verwendet aber zur Umwandlung des Kreatins in die wasserärmere Verbindung nicht 5 cm³ konzentrierte, sondern 5 cm³ normale Salzsäure auf 10 cm³ Harn, erhitzt indessen 3 Stunden auf dem Wasserbad. *Baur* und *Barschall*[3]) sind die ersten, welche Kreatininbestimmungen in Fleischextrakt ausgeführt haben; sie erhitzen mit gleich starker Säure 4 Stunden lang auf dem Wasserbad.

Geret[4]) bringt einen kritischen Ueberblick über die bis dahin erschienene Literatur und empfiehlt die Folin'sche Methode als erster für Suppenwürfel, ohne aber eine spezielle eigene Vorschrift aufzustellen. Nach

[1]) Z. U. N. G. **29**, 1, 1915.
[2]) Zeitschr. physiol. Chem. **41**, 223, 1904.
[3]) Arb. Kais. Ges.-Amt **24**, 562, 1906.
[4]) Z. U. N. G. **24**, 572, 1912.

einem vor wenigen Jahren gehaltenen Vortrag[5]) arbeitet er ähnlich wie die genannten Autoren, speziell wie *Sudendorf* und *Lahrmann*, durch Eindampfen von 20 cm³ Flüssigkeit mit 10 cm³ n-Salzsäure während 2 Stunden.

Wenn ich in der vorliegenden Arbeit bei der starken Säurekonzentration, 5 cm³ konzentrierter Salzsäure zu 10 cm³ Lösung, geblieben bin, so geschah dies hauptsächlich der Zeitersparnis wegen. Diese Flüssigkeit lässt sich in einem halbkugeligen Schälchen von 7,5 cm Durchmesser in 40 bis 50 Minuten auf dem Wasserbad eindampfen, was gegenüber dem 2 bis 4stündigen Erhitzen der genannten Autoren gewiss einen Vorteil bedeutet.

Den Anlass zu den vorliegenden Untersuchungen gab eine Besprechung mit Herrn Dr. Lotter, Chemiker der Eidg. Oberzolldirektion.

Hefepräparate und dergleichen sind einem höhern Zollansatz unterworfen, wenn sie Fleischextrakt enthalten, als wenn sie frei davon sind. Nun geben Hefepräparate jeweilen eine gewisse leichte Kreatininreaktion; sie ist aber so gering, dass die Oberzolldirektion bisher davon absah, sie als vom Fleischextrakt herrührend anzusehen, da der Zusatz so kleiner Fleischextraktmengen doch recht unwahrscheinlich war. Immerhin musste die Frage nach der Herkunft dieser Reaktion einstweilen offen gelassen werden. Eine genaue Bestimmung des scheinbaren oder wirklichen Kreatiningehaltes war in diesen Fällen dadurch erschwert, dass man auch bei Verwendung grosser Mengen Ausgangsmaterial nicht auf die vorgeschriebene Schichthöhe im Kolorimeter kam.

Es ergab sich somit die doppelte Aufgabe, erstens einmal die Kreatininbestimmungsmethode derart zu modifizieren, dass sich auch kleinste Mengen kolorimetrisch bestimmen lassen, zweitens die Frage zu untersuchen, ob der die Reaktion verursachende Körper bei Hefeextrakten mit Kreatin oder Kreatinin identisch sei oder nicht.

1. Die Kolorimetrierung des Kreatinins.

a) Im Kolorimeter nach Duboscq.

Die kolorimetrische Bestimmung des Kreatinins erfolgt nach *Folin* (l. c.) durch Vergleichen mit einer 0,5 n-Bichromatlösung, und zwar derart, dass diese Lösung in einem Kolorimeter nach Duboscq auf die Schichthöhe von 8 mm eingestellt wird. Wenn die Farbreaktion so ausgeführt wird, dass der Eindampfrückstand mit 15 cm³ 1,2%iger Pikrinsäure und 10 cm³ 10%iger Natronlauge versetzt und nach 5 Minuten auf 500 cm³ verdünnt wird, so ergeben 10 mg Kreatinin bei einer Schichthöhe von 8,1 mm Farbgleichheit.

Der Kreatiningehalt in 500 cm³ Reaktionsflüssigkeit ergibt sich durch Division von 8,1 durch h, wobei h = Schichthöhe des Reaktionsproduktes.

Die Schichthöhe der Bichromatlösung darf nicht variiert werden, sie ist stets auf 8 mm einzustellen, diejenige des Reaktionsproduktes soll innert 5 und 13 mm liegen, sonst wird die Bestimmung ungenau.

[5]) Diese Mitt. 25, 196, 1934.

Das Festhalten an der einmal gegebenen Schichthöhe von 8 mm Bichromat ist deshalb notwendig, weil unsere Färbung aus zwei Komponenten zusammengesetzt ist, aus dem orangeroten Reaktionsprodukt und dem überschüssigen, gelb gefärbten Natriumpikrat, welches in ganz erheblichem, bei Gegenwart von 10 mg Kreatin in ungefähr 10fachem Ueberschuss zugegen ist. Seine Färbung kann als praktisch konstant angesehen werden. Wenn wir daher einen konstanten Faktor in die Berechnung einführen, welcher der Pikratfärbung entspricht, muss es möglich sein, eine Berechnungsformel aufzustellen, welche erlaubt, bei jeder beliebigen Schichthöhe, solange wenigstens der Farbton der zu vergleichenden Lösungen genügend ähnlich ist, Messungen vorzunehmen. Damit ist aber auch ein Weg gegeben, bedeutend kleinere Kreatininmengen als bisher zu bestimmen.

Die folgenden Versuche wurden mit reinstem, aus Wasser nochmals umkristallisiertem und bei 105° getrocknetem Kreatin vorgenommen.

115,9 mg Kreatin, entsprechend 100 mg Kreatinin, wurden zu 100 cm³ gelöst. 10 cm³ dieser Lösung wurden mit 5 cm³ konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbad in einem tiefen Porzellanschälchen von 7,5 cm Durchmesser zur Trockne verdampft und der Rückstand mit 50 cm³ Wasser aufgenommen. Von dieser Lösung wurden sinkende Mengen von 5 cm³ abwärts mit je 1,5 cm³ 1,2%iger Pikrinsäurelösung und 1 cm³ 10%iger Natronlauge versetzt, nach 5 Minuten auf 50 cm³ verdünnt und sofort kolorimetriert.

Unser Endprodukt enthält dieselbe Pikrinsäure- und Natronlaugemenge wie nach Folin, wir arbeiten aber mit 10mal kleinern Mengen, nehmen also 1,5 cm³ Pikrinsäurelösung auf 50 cm³ statt 15 cm³ auf 500, da die kleinere Menge vollauf genügt. Wir arbeiten mit 1,0, 0,8, 0,6, 0,4 und 0,2 mg Kreatinin in 50 cm³.

Die Reaktionslösungen jeden Kreatiningehaltes wurden in verschiedenen Schichthöhen mit 0,5 n-Bichromatlösung verglichen. Tragen wir die Werte graphisch auf, so erhalten wir für jeden Kreatiningehalt eine Gerade, die aber nicht im Nullpunkt endet, sondern auf der Minusseite. Um proportionale Werte zu bekommen, müssen wir zu den Bichromatwerten einen bestimmten Betrag addieren, den Betrag, welcher dem Natriumpikrat entspricht. Wir können ihn nicht gut durch direktes Vergleichen einer Pikratlösung mit der Bichromatlösung bestimmen, da die Färbungen zu ungleich sind; er liess sich aber leicht durch Berechnung finden. Der Betrag macht 2,3 mm aus.

Addieren wir zu den Bichromatschichthöhen 2,3 mm, sodass wir beispielsweise 3,3 statt 1 mm und 12,3 statt 10 mm annehmen und dividieren durch die Schichthöhe des Kreatinin-Reaktionsproduktes, so erhalten wir innert der Fehlergrenze Werte, welche nach Multiplikation mit dem empirischen Faktor 0,787 die mg Kreatinin in 50 cm³ Lösung ergeben.

Wir haben also die Formel:

$$\text{mg Kreatinin in 50 cm}^3\text{ Reaktionsflüssigkeit} = \frac{h + 2{,}3}{h_1} \cdot 0{,}787,$$

wobei h = mm 0,5 n-Bichromatlösung,

h_1 = mm Kreatinin-Reaktionsprodukt.

Bei der Schichthöhe 8 mm der Bichromatlösung stimmt die Berechnung ziemlich genau mit derjenigen von Folin überein, denn (8 + 2,3) . 0,787 = 8,106, also praktisch 8,1, die Zahl, die Folin seiner Berechnung zugrunde legt.

Die folgende Tabelle gibt die nach unserer Formel erhaltenen Werte wieder:

Tabelle 1.

Kreatininbestimmungen, im Kolorimeter nach Duboscq ausgeführt.

verwendete mg Kreatinin							
	h	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
	h_1	9,87	8,06	6,55	5,0	3,4	3,07
1,0	mg Kreatinin	0,979	0,989	0,989	0,992	0,995	0,857 *)
	Fehler	— 0,021	— 0,002	— 0,002	— 0,008	— 0,005	— 0,143
	h	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
	h_1	11,7	10,02	8,08	6,17	4,3	3,3
0,8	mg Kreatinin	0,825	0,805	0,810	0,803	0,787	0,787
	Fehler	+ 0,025	+ 0,005	+ 0,010	+ 0,003	— 0,013	+ 0,013
	h	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
	h_1	15,82	13,3	11,28	8,26	6,30	4,66
0,6	mg Kreatinin	0,610	0,610	0,579	0,600	0,537 *)	0,557 *)
	Fehler	+ 0,010	+ 0,010	+ 0,031	0	— 0,063	— 0,043
	h	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	—
	h_1	22,92	19,63	16,78	12,12	8,96	—
0,4	mg Kreatinin	0,423	0,413	0,390	0,409	0,376	—
	Fehler	+ 0,023	+ 0,013	+ 0,010	+ 0,009	— 0,024	—
	h	—	—	0,6	0,4	0,2	0,1
	h_1	—	—	33,47	24,32	15,30	9,45
0,2	mg Kreatinin	—	—	0,195	0,204	0,221	0,275 *)
	Fehler	—	—	— 0,005	+ 0,004	+ 0,021	+ 0,075

Wenn wir von einigen Ausnahmen absehen, den mit *) bezeichneten Bestimmungen, so weichen die Zahlen nicht allzusehr vom wirklichen Gehalt ab. Die Mittelwerte bei den einzelnen Gehalten sind ohne Berücksichtigung der mit *) bezeichneten Proben: bei 1,0 mg 0,989, bei 0,8 mg 0,802, bei 0,6 mg 0,600, bei 0,4 mg 0,422, bei 0,2 mg 0,207. Wenn wir das Mittel der Abweichungen nehmen, so kompensieren sie sich bei auf die 2. Dezimale zu Null. Damit ist also die mittlere Uebereinstimmung mit dem von *Folin* angegebenen Verhältnis zwischen Bichromat und Kreatininlösung erreicht.

Unsere Berechnungsart gestattet uns, sehr kleine Kreatiningehalte bei beinahe beliebigen Bichromatschichthöhen zu messen. Immerhin ist es angezeigt, die Bichromatschichthöhe dem Kreatiningehalt einigermassen anzupassen. Höhen unter 2 mm sollten nur verwendet werden, wenn allerkleinste Kreatininmengen da sind. Unsere mit 1 mm erhaltenen Werte stimmen am wenigsten gut.

b) Im Walpol'schen Komparator.

Wir haben gesehen, dass sich die zu kolorimetrierende Färbung zusammensetzt aus dem Reaktionsprodukt des Kreatinins und aus Natriumpikrat. Dazu kommt nun noch eine gewisse Eigenfärbung der Lösung, welche nicht in allen Fällen zu vernachlässigen ist. Besonders, wenn man die Reaktion bei sehr kreatininarmen oder -freien Produkten wie Hefeextrakten ausführt und dabei ziemlich viel Material verarbeiten muss, kann die Eigenfarbe störend wirken. Im Duboscq-Kolorimeter lässt sie sich nicht kompensieren, wohl aber ist das leicht möglich bei Verwendung eines Walpol'schen Komparators. Ich ging daher dazu über, die Bestimmungen in diesem Apparat auszuführen. Er besteht aus einem schwarz gestrichenen Holzblock mit 4 senkrechten, zu 2 und 2 hintereinander angeordneten Bohrungen von 18 mm Durchmesser, welche zum Hineinstellen von Reagensgläsern bestimmt sind. In mittlerer Höhe des Blocks sind zwei waagrechte, die senkrechten kreuzende Bohrungen von 12 mm Durchmesser angebracht, welche gestatten, durch je zwei hintereinander geschaltete Reagensgläser hin durchzublicken. Ich habe mir nun bereits vor längerer Zeit[6]) einen Block herstellen lassen, bei welchem die Bohrungen nicht parallel, sondern divergierend angebracht sind, derart, dass sich die Schnittpunkte ihrer Achsen in der Entfernung von ungefähr 20 cm im Auge treffen. Man kann daher, ohne den Kopf zu bewegen, bequem gleichzeitig durch beide Löcher hindurchsehen.

Man gibt in die vordere, linke Bohrung ein Reagensglas mit dem zu prüfenden Reaktionsgemisch und dahinter ein solches mit Wasser. In die rechte hintere Bohrung kommt die auf entsprechende Konzentration gebrachte Flüssigkeit ohne Zusatz des Pikratreagenses. Davor kommt ein Reagensglas mit 4 cm^3 destilliertem Wasser. Dazu setzt man nun mit einer in $^1/_{100}$ cm^3 eingeteilten 1-cm^3-Präzisions-Messpipette oder einer entsprechenden Bürette portionenweise vorsichtig unter Umschwenken 0,5 n-Bichromatlösung zu, bis die Färbungen rechts und links gleich sind. Man beobachtet am besten gegen ein helles, mattiertes Fenster. Selbstverständlich sind Reagensgläser mit gleichem Durchmesser zu wählen.

Durch Dahinterschalten der nicht mit dem Reagens versetzten Flüssigkeit hinter die Bichromatlösung ist die Eigenfarbe der Reaktionsflüssigkeit ausgeschaltet.

Bei der Berechnung müssen wir auch hier wieder die Farbe des Pikrats durch einen konstanten Faktor kompensieren, den wir bei dieser Anordnung nicht zu der Bichromatlösung zuzählen, sondern davon abziehen müssen. Er beträgt 0,08 cm^3 0,5 n-Bichromat. Es zeigt sich nun eine merkwürdige Gesetzmässigkeit. Die Quadratwurzel aus den $^1/_{100}$ cm^3 Bichromatlösung minus 8, die zu 4 cm^3 Wasser zuzusetzen sind, dividiert durch die mg Kreatinin in 50 cm^3 ist eine Konstante; sie beträgt 32,5.

---

[6]) Siehe *Ch. Schweizer*, diese Mitt. **20**, 205, 1929.

Die Berechnung lässt sich demnach durchführen nach der Formel:

$$\text{mg Kreatinin in 50 cm}^3 = \frac{\sqrt{100b-8}}{32,5},$$

wobei b = cm³ 0,5 n-$K_2Cr_2O_7$, die zu 4 cm³ Wasser zugesetzt worden sind.

Die gleichen Lösungen, welche die in Tabelle 1 wiedergegebenen Werte geliefert hatten, ergaben im Komparator bei dieser Berechnung folgende Zahlen:

Tabelle 2.

Kreatininbestimmungen, im Komparator ausgeführt.

verwendete mg Kreatinin	Verdünnung	cm³ 0,5 n-Bichromat	mg Kreat. in der verdünnten Lsg.	mg Kreatinin gefunden	Fehler
1,0	1 + 3	0,73	0,249	0,996	— 0,004
0,8	1 + 2,5	0,64	0,231	0,808	+ 0,008
0,6	1 + 1,5	0,70	0,243	0,606	+ 0,006
0,4	—	1,80	0,405	0,405	+ 0,005
0,2	—	0,56	0,207	0,207	+ 0,006

Die Resultate sind durchaus befriedigend. Die Methode lässt sich aber nur bei kleinen Gehalten direkt anwenden. Sind die Färbungen zu stark, so verdünnt man sie mit einer Pikratlösung, welche man sich durch Verdünnen von 3 cm³ 1,2%iger Pikrinsäurelösung und 2 cm³ 10%iger Natronlauge auf 100 cm³ herstellt. Sie entspricht dem Pikratgehalt, welcher bei Ausführung der Reaktion auftritt.

Bei der soeben mitgeteilten Versuchsreihe wurden die Lösungen gleich auf passende Konzentration verdünnt, da bereits einige Erfahrung vorlag. Folgende vorher mit einem Fleischextrakt von bekanntem Gesamt-Kreatiningehalt durchgeführte Versuchsreihe, bei welcher die Verdünnung unterblieb, zeigt, bis zu welchen Gehalten die Methode anwendbar ist und welches die Genauigkeit bei den verschiedenen Gehalten ist.

Tabelle 3.

Gesamt-Kreatininbestimmungen im Fleischextrakt nach der Komparatormethode.

verwendete cm³ einer bestimmten Lösung	cm³ Bichromat	mg Gesamt-Kreatinin	Berechn. Werte mg in 50 cm³	Fehler
0	0,08	0	0	—
0,0125	0,09	0,031	0,038	— 0,007
0,025	0,14	0,076	0,076	0
0,05	0,33	0,154	0,152	+ 0,002
0,100	1,07	0,306	0,304	+ 0,002
0,15	2,15	0,450	0,456	— 0,006
0,20	4,50	0,647	0,608	+ 0,039

Die Resultate sind sehr regelmässig ausgefallen. Einzig der höchste, mit 0,6 mg Kreatinin ausgeführte Versuch, ist mit einem erheblichen Fehler behaftet. Hier ist die Kreatininmenge zu hoch; so starke Lösungen lassen sich nicht mehr gut vergleichen, man sollte nicht über 0,5 mg

Kreatinin bzw. über 2,5 cm³ Bichromatlösung gehen. Bei höhern Gehalten verdünnt man die Lösung wie angegeben.

Die Komparatormethode gibt uns also die Möglichkeit, Kreatiningehalte ebensogut wie im Duboscq-Kolorimeter von den kleinsten Mengen an zu bestimmen. Sie bietet dabei noch den Vorteil, die Eigenfarbe der Lösung auszuschalten, was im Duboscq-Apparat nicht möglich ist.

Ich führte auch einige Versuchsreihen in Pulfrichs Stufen-Photometer aus. Mit Fleischextrakt lässt sich auch in diesem Apparat gut arbeiten; bei Hefeextrakten fielen aber die Leerwerte bedeutend höher aus als nach den soeben beschriebenen beiden Methoden. Ich gehe daher auf diese Versuche hier nicht näher ein. Auch der Umstand, dass dieser kostspielige Apparat keine allgemeine Verbreitung besitzt, erübrigt es, ihn für diesen Zweck zu empfehlen.

2. Versuche mit verschiedenen Proteinkörpern.

Nach der Literatur reagieren ausser Kreatinin noch andere Stoffe mit Natriumpikrat in ähnlicher Weise und können gelegentlich Anlass zu Störungen geben. Nach *Sudendorf* und *Lahrmann*[7]) gibt Tomatensaft eine analoge Färbung. Die Behandlung mit Permanganat, welche diese Autoren empfehlen, geschieht gerade, um die Wirkung des Tomatensaftes zu zerstören und auch in der Annahme, dass andere Pflanzenextrakte, die etwa in Bouillonpräparaten zugegen sein könnten, in gleicher Weise unschädlich gemacht würden. Nach *Mohler* und *Helberg*[8]) ist auch Gelatine geeignet, nach der Salzsäurehydrolyse Kreatinin vorzutäuschen, und zwar sind es speziell die Aminosäuren Glykokoll, Arginin und Histidin, welche sich analog dem Kreatinin verhalten. Ich[9]) habe gezeigt, dass auch Kaseinabbauprodukte, wie sie im Käse vorliegen, die Reaktion bereits vor dem Eindampfen mit Salzsäure, stärker aber nach dem Eindampfen geben. Es ist anzunehmen, dass jedes Protein nach der Hydrolyse eine dem Kreatinin ähnliche Reaktion mit Natriumpikrat liefert. Glücklicherweise sind aber diese Reaktionen alle ziemlich schwach.

Von den in der nächsten Tabelle aufgeführten Proteinen wurden je 0,2 g in 10 cm³ Wasser gelöst, wo nötig unter Zusatz von etwas Alkali. Nach Zusatz von 5 cm³ konzentrierter Salzsäure dampfte man auf dem Wasserbad ein, führte aber die Reinigung hier nicht nach *Sudendorf* und *Lahrmann* durch Permanganatoxydation, sondern nach einem einfachern Verfahren durch. Der Eindampfrückstand wurde mit 10 cm³ Wasser aufgenommen und mit überschüssigem Calciumkarbonat in einem Reagensglas eben aufgekocht. Um das Schäumen zu verhüten, kann man einen Tropfen Amylalkohol zusetzen. Nach dem Abkühlen wurde filtriert. 5 cm³ Filtrat, entsprechend 0,1 g Substanz wurden eingedampft und in gewohnter Weise mit 1,5 cm³ Pikrinsäure und 1 cm³ Natronlauge auf 50 cm³ gebracht und

[7]) l. c.
[8]) Z. U. L. **68**, 254, 1934.
[9]) Diese Mitt. **29**, 10, 1938.

nach dem Filtrieren kolorimetriert. 1 cm³ Filtrat wurde besonders eingedampft, der Rückstand unter Zusatz von 2 Tropfen Natronlauge in 10 cm³ Wasser gelöst und ebenfalls filtriert. Diese Lösung diente zur Kompensation der Eigenfarbe im Komparator.

Diese Eigenfarbe war nirgends bedeutend, aber doch merkbar. Die Hauptmenge der bei der Säurebehandlung entstandenen dunkeln, humusartigen Stoffe liess sich durch die Calciumkarbonatbehandlung entfernen.

Man erhielt folgende Werte:

Tabelle 4.

Scheinbare Gesamt-Kreatiningehalte in Proteinen.

	Im Duboscq-Kolorimeter	Im Komparator
	%	%
Gelatine	0,064	0,044
Eieralbumin	0,142	0,075
Kasein	0,075	0,062
Gluten	0,121	0,102

Bei Eieralbumin und Gluten erhält man, im Duboscq-Apparat gemessen, ungefähr doppelt so hohe Werte wie bei Gelatine und Kasein. Die im Komparator erhaltenen Zahlen liegen durchwegs tiefer als die im Duboscq gemessenen. Besonders bei Eieralbumin ist die Differenz erheblich. Sie rührt zum Teil von der Eigenfarbe des Filtrats her, die ja nur im Komparator ausgeglichen ist. Dazu kommt aber noch ein Umstand, der aus den angegebenen Zahlen nicht hervorgeht. Wenn man im Duboscq mit verschiedenen Schichthöhen Bichromat vergleicht, so erhält man nicht die gleichmässigen Werte, die mit reinem Kreatinin oder Fleischextrakt erhalten werden. Diese Verhältnisse werden an anderm Material noch näher erläutert werden.

Wenn wir von den genannten Unregelmässigkeiten absehen, so fällt uns auf, dass überall nur recht geringe scheinbare Kreatiningehalte gefunden worden sind. Sie würden ungefähr 1—2% Fleischextrakt entsprechen, wenn wir den mittlern Kreatiningehalt des Fleischextraktes zu etwa 6% annehmen.

Dass es sich aber bei diesen Reaktionen um etwas anderes als Kreatinin handelt, geht aus folgendem hervor: Wenn wir das Reaktionsprodukt von Kreatinin aufkochen und die Lösung erkalten lassen, so verschwindet die Rotfärbung; sie macht der gelben Farbe des Natriumpikrats Platz. Anders verhalten sich diese Proteine. Es wurden je 20 cm³ des Reaktionsproduktes in Erlenmeyerkölbchen aufgekocht und nach dem Erkalten im Duboscq-Apparat geprüft. Man fand folgende Gesamtzahlen an Kreatinin:

	Gelatine	Albumin	Kasein	Gluten
Vor dem Erhitzen . .	0,064	0,142	0,075	0,121
Nach » » . .	0,063	0,261	0,110	0,357
Prozentuale Aenderung	— 2 %	+ 84 %	+ 47 %	+ 195 %

Bei Gelatine ist die Färbung ungefähr gleich geblieben, bei den andern Proteinen hat sie um 47—195% zugenommen. Man wird also durch die

Farbmessung nach dem Erhitzen in vielen Fällen erkennen können, ob störende Stoffe zugegen sind, man kann sie aber nicht neben dem Kreatinin durch Berechnung ausschalten, da sie sich je nach dem Ausgangsmaterial verschieden verhalten. In gewissen Fällen könnte vielleicht der Grad der Zunahme der Reaktionsstärke beim Erhitzen als Reaktion auf bestimmte Eiweisstoffe verwertet werden.

3. Versuche mit Hefepräparaten und Tomatensaft.

Zunächst wurde mit selbst bereiteten Hefezubereitungen gearbeitet, und zwar mit frischer, mit autolysierter und mit im Autoklav hydrolysierter Presshefe. Zur Reaktion gelangte schliesslich eine Menge, welche 0,5 g frischer Hefe entsprach. Wie sich später zeigte, sollte nicht so viel Material verwendet werden. Trotzdem sind aber diese Versuche wenigstens unter sich vergleichbar.

Man hielt sich im ganzen an die bisherige Arbeitsweise. Von frischer Hefe wurden 5 g mit 5 cm^3 Wasser aufgeschwemmt und mit 5 cm^3 konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbad eingedampft. Die Probe unterlag somit der schwachen Hydrolyse, welche mit der Methode des Lebensmittelbuches verbunden ist. Es folgte die Behandlung mit Calciumkarbonat. Das Filtrat wurde einerseits direkt, anderseits nach Oxydation mit Permanganat analog der Arbeitsweise von *Sudendorf* und *Lahrmann* verarbeitet. Die Kolorimetrierung geschah im Duboscq-Apparat und im Komparator.

Zur Autolyse wurde die Presshefe während 24 Stunden bei 50° gehalten. Man prüfte nun eine Probe direkt, ohne sie mit Salzsäure einzudampfen, auf die bei der Autolyse entstandenen, wie Kreatinin reagierenden Stoffe, anderseits wurde wie bei frischer Hefe schwach hydrolysiert.

Die Autoklavhydrolyse geschah durch 50 Minuten langes Erhitzen von 100 g Hefe mit 50 cm^3 konzentrierter Salzsäure bei 2 Atmosphären Ueberdruck. Die Verarbeitung erfolgte wieder in der geschilderten Weise.

Es wurden folgende Resultate erhalten:

Tabelle 5.

Scheinbarer Prozentgehalt an Gesamt-Kreatinin in verschieden vorbehandelter Hefe.

Im Duboscq bei h:		8 %	4 %	2 %	1 %	im Komparator %
schwach hydrolysiert	a) ohne $KMnO_4$ . .	—	0,044	0,035	0,033	0,026
	b) mit $KMnO_4$ . .	—	0,040	0,045	0,049	0,031
autolysiert	a) ohne HCl eingedampft	—	—	—	0,013	0,007
	b) ohne $KMnO_4$ . .	—	—	0,029	0,044	0,020
	c) mit $KMnO_4$ . .	—	—	0,023	0,031	0,027
im Autoklav hydrolysiert	a) ohne $KMnO_4$ . .	0,146	0,146	0,163	0,173	0,130
	b) ohne $KMnO_4$ . .	0,083	0,090	0,104	0,129	0,091

Bei diesen Resultaten fällt vor allem auf, dass die im Komparator erhaltenen Werte durchwegs niedriger sind als die im Duboscq erhaltenen. Die Ursache liegt auch hier nicht nur in der Ausschaltung der Eigenfärbung. Wie bereits erwähnt, ist diese nach unserer Calciumkarbonatbehandlung ziemlich gering, und zudem sind ja auch die nach der Permanganatoxydation erhaltenen Werte im Komparator niedriger. Der Grund liegt offenbar darin, dass die reagierenden Stoffe eben nicht identisch sind mit Kreatinin, welches ja den Berechnungsformeln zugrunde liegt.

Die im Duboscq-Apparat bei verschiedener Schichthöhe des Kaliumbichromats erhaltenen Werte sind ebenfalls mehr oder weniger ungleich ausgefallen, während wir gesehen haben, dass Kreatinin gleichmässige Werte liefert. Diese Differenzen sind bei den verschieden vorbehandelten Proben verschieden, am grössten sind sie bei der Autoklavhydrolyse nach der Permanganatoxydation. Interessant ist es, dass die Werte mit sinkender Schichthöhe bei der schwach hydrolysierten Hefe abnehmen, bei der autolysierten und der im Autoklav hydrolysierten aber zunehmen. Das deutet darauf hin, dass wir es mit einer ganzen Reihe von reagierenden Stoffen, vermutlich Aminosäuren, zu tun haben und dass deren Abspaltung aus dem Proteinmolekül je nach der Art des Angriffs verschieden verläuft. Dass hier grosse qualitative Unterschiede herrschen, zeigt uns auch die verschiedene Wirkung der Permanganatoxydation. Bei der schwach mit Salzsäure hydrolysierten Hefe und bei der autolysierten Hefe hat die Oxydation das Resultat nicht deutlich geändert, bei der stark hydrolysierten hat sie eine starke Erniedrigung hervorgerufen.

Betrachten wir nun die Wirkung der verschiedenen Vorbehandlungen.

Die schwache Hydrolyse, wie sie nach der Vorschrift des Lebensmittelbuches erfolgt, hat ungefähr 0,03—0,05% scheinbares Kreatinin ergeben. Durch die Autolyse ist nur ungefähr 0,01% entstanden. Wird aber das autolysierte Produkt schwach hydrolysiert, so finden wir nicht den vorigen Wert zuzüglich 0,01%, sondern sogar eine schwache Erniedrigung. Aus der autolysierten Hefe wird also durch die schwache Hydrolyse weniger von den reagierenden Stoffen abgespalten als aus der frischen Hefe. Durch die Autoklavhydrolyse sind die reagierenden Stoffe gut auf das 10fache gestiegen.

Da *Sudendorf* und *Lahrmann* die Permanganatoxydation hauptsächlich zur Zerstörung der wirksamen Stoffe in Tomatensaft eingeführt haben, wurde nun ein Tomatenpüree des Handels untersucht. Man arbeitete wieder wie gewohnt und fand:

% Kreatinin bei h:	8	4	2	1	im Komparator
a) ohne $KMnO_4$	0,194	0,193	0,204	0,203	0,145
b) mit $KMnO_4$	0,125	0,113	0,119	0,131	0,070

Durch die Permanganatoxydation ist der scheinbare Kreatiningehalt auf nahezu die Hälfte gesunken. Die Wirkung ist also tatsächlich bedeutend stärker als bei unserer hydrolysierten Hefe.

Untersuchen wir nun die Wirkung der Oxydation auf ein Hefepräparat des Handels. Vier solcher Präparate sind mir von der Schweiz. Oberzolldirektion zur Verfügung gestellt worden. Ein Vitamin-Hefeextrakt ergab:

% Kreatinin bei h:	8	4	2	1	im Komparator
a) ohne $KMnO_4$	—	0,213	0,206	0,234	0,185
b) mit $KMnO_4$	0,406	0,355	0,377	—	0,295

Bei diesem Präparat hat nun die Permanganatoxydation nicht genützt, sondern geschadet; die wirksamen Stoffe sind dadurch ganz erheblich vermehrt worden. So günstig diese Behandlungsweise also bei Tomatensaft wirkt, so ungünstig wirkt sie hier.

4. Variation der Säurebehandlung.

Dass die bisher angewendete Säurebehandlung, Eindampfen von 10 cm^3 Flüssigkeit mit 5 cm^3 konzentrierter Salzsäure, eine quantitative Umwandlung von Kreatin in Kreatinin bewirkt, geht daraus hervor, dass wir genau die von *Folin* geforderte Schichthöhe im Duboscq-Kolorimeter finden. Als geringere Säureeinwirkung wählte ich das Eindampfen von nur 2 cm^3 Flüssigkeit mit 1 cm^3 konzentrierter Salzsäure. Die Säurekonzentration ist zwar hier dieselbe, das Eindampfen dauert aber nur etwa 15 Minuten, sodass eine schwächere Wirkung zu erwarten ist. Als geringste Einwirkung wurde ein Zusatz von 0,1 cm^3 konzentrierter Säure zu 2 cm^3 Lösung verwendet. Der Rückstand wurde dann nochmals mit 0,2 cm^3 Salzsäure befeuchtet und wieder eingedampft.

Man erhielt nach den verschiedenen Eindampfungsverfahren folgende Zahlen:

Tabelle 6.

Einfluss der Salzsäurevorbehandlung auf die Kreatininreaktion.

HCl-Zusatz	a) 10 cm^3 + 5 cm^3 HCl	b) 2 cm^3 + 1 cm^3 HCl	% von a)	c) 2 cm^3 + 0,1 cm^3 HCl	% von c)
Kreatinin	10,0 mg	9,7 mg	97	—	—
Fleischextrakt . .	6,70 %	6,53 %	98	5,60 %	84
Presshefe	0,026 »	0,022 »	85	—	—
Vitamin-Hefeextrakt	0,19 »	0,14 »	74	0,10 %	53
Tomatenpurée . .	0,15 »	0,09 »	60	—	—

Das Eindampfen von nur 2 + 1 cm^3 statt 10 + 5 cm^3 erniedrigt den Wert bei Kreatin und Fleischextrakt nur sehr wenig, bedeutend mehr aber bei den andern Produkten. Das Eindampfen mit der 10fach geringern Salzsäuremenge gibt bei Fleischextrakt immerhin noch 84%. Bei Vitamin-Hefeextrakt finden wir bei diesem Vorgehen 53%. Nach diesen Resultaten wurde am ursprünglichen Verfahren festgehalten.

5. Versuche mit Kreatinzusätzen zu Hefeextrakten.

Die 4 erwähnten Hefeextrakte, welche mir von der Eidg. Oberzolldirektion zur Verfügung gestellt worden waren, ergaben bei Verarbeitung

von so viel Material, dass die Endreaktion mit 0,5 g ausgeführt wurde, im Duboscq-Apparat, bei angemessener Schichthöhe gemessen, folgende Werte:

1. Vitamin-Hefeextrakt 0,055% scheinbares Gesamt-Kreatinin
2. Hefeextrakt 789 0,026% scheinbares Gesamt-Kreatinin
3. Hefeextrakt T. B. 0,030% scheinbares Gesamt-Kreatinin
4. Hefeextrakt, trocken 0,033% scheinbares Gesamt-Kreatinin

Es wird ausdrücklich erwähnt, dass hier überall 0,5 g Extrakt zur Reaktion gelangt sind, weil die Reaktion, wie wir sehen werden, sehr von der Menge des verwendeten Materials abhängt.

Wenn im folgenden von bestimmten Kreatininzusätzen die Rede ist, so ist darunter diejenige Menge Kreatin, welche der angegebenen Menge Kreatinin entspricht, zu verstehen.

Nr. 1 ergab nach Zusatz von 0,1% Kreatinin 0,121 oder nach Abzug des Blindwertes 0,066%, also nur 66% des Zugesetzten.

Nr. 2, mit 0,05% Kreatinin versetzt, ergab 0,049% oder nach Abzug des Blindwertes 0,023, was 46% des Zugesetzten ausmacht.

Wo rühren diese Verluste her? Man dachte zunächst an zwei Möglichkeiten. Entweder könnte Kreatinin durch das Calciumkarbonat, welches wir zum Neutralisieren der Eindampfrückstände verwenden, zusammen mit den humusartigen Verunreinigungen adsorbiert werden; oder aber, die zugesetzte Pikrinsäure könnte unzureichend sein. Die erste Ursache müsste sich bemerkbar machen beim Verdünnen der Eindampfrückstände mit wechselnden Wassermengen, die zweite bei Verarbeitung wechselnder Filtratmengen.

Bei den nächsten, mit dem Hefeextrakt Nr. 3 ausgeführten Versuchen wurden die Eindampfrückstände von je 1 g Extrakt, welche unter Zusatz von 0,1% Kreatinin gewonnen worden waren, mit 10, 20 und 30 cm³ Wasser aufgenommen, mit Calciumkarbonat behandelt und filtriert. Von den Filtraten wurde die 0,5 und 0,25 g Ausgangsmaterial entsprechende Menge mit je 1,5 cm³ Pikrinsäure in Reaktion gebracht. Man fand:

Tabelle 7.

Variation der Konzentration und der Materialmenge.

Lösungswasser	Extraktmenge	% Kreatinin	Blindwerte	Reinwerte
10	0,5	0,054	0,030	0,024
	0,25	0,091	0,040	0,051
20	0,5	0,048	0,030	0,018
	0,25	0,099	0,040	0,059
30	0,5	0,058	0,030	0,028
	0,25	0,079	0,040	0,039

Wie wir sehen, kommt es nicht darauf an, ob 10, 20 oder 30 cm³ Wasser zum Auflösen des Eindampfrückstandes verwendet werden. Eine Adsorption von Kreatinin an das Calciumkarbonat tritt nicht ein. Von grosser Be-

deutung ist es aber, ob 0,5 oder nur 0,25 g Material zur Reaktion gelangt. Im letztern Fall ist die Pikrinsäure in relativ doppelt so grosser Menge zugegen, wodurch die Resultate ganz bedeutend erhöht werden; sie sind aber immer noch viel zu niedrig.

Es wurde zwar weiter oben angegeben, dass die Pikrinsäure bei unserer Reaktion in ungefähr 10fachem Ueberschuss vorhanden sei und dies lässt sich auch durch folgenden Versuch belegen. Ein Fleischextrakt mit einem Gehalt von 6,35% Gesamt-Kreatinin wurde in 10fach grösserer Menge als unserer normalen Vorschrift entspricht, mit den vorgeschriebenen 1,5 cm^3 Pikrinsäure in Reaktion gebracht. Man fand 6,07% Gesamt-Kreatinin, also 95% des normalen Wertes. Eine relative Verminderung der Pikrinsäure auf $^1/_{10}$ hatte also nur einen Verlust von 5% bewirkt.

Wenn unsere Hefeextrakte einen so hohen Pikrinsäurebedarf haben, so kann dies wohl nur daher rühren, dass sie damit irgendwelche schwach gefärbte Verbindungen in verhältnismässig grosser Menge geben.

Da nun die Möglichkeit vorlag, dass die starke Salzsäurebehandlung, welche wir bisher stets vorgenommen haben, die Hefeextrakte übermässig hydrolysiert und damit die Ursache des grossen Pikrinsäureverbrauches ist, versuchte man nun mit geringern Konzentrationen zu arbeiten. Man führte 3 Versuchsreihen mit 0,5normal, normal und doppeltnormalsalzsauren Lösungen, immer mit steigenden Kreatinzusätzen aus, während wir bisher 4fachnormale Lösungen eingedampft hatten. Um von vorneherein möglichst günstige Bedingungen zu schaffen, wurde nur die 0,1 g Material entsprechende Menge in Reaktion gebracht.

Als vor Beginn der Versuche eine reine Kreatinlösung in 0,5 n-HCl eingedampft wurde, und zwar nach der Vorschrift von *Sudendorf* und *Lahrmann* während 2 Stunden, fand man überraschenderweise nur 90,5% des zugesetzten, während eine normale Säure 99%, eine 4normale den theoretischen Wert ergab.

Tabelle 8.

Hefeextrakt Nr. 3 mit Kreatininzusätzen und steigenden Säurekonzentrationen bei Verarbeitung von 0,1 g.

	0,5 n-Salzsäure				n-Salzsäure			2 n-Salzsäure			
% Kreatinin zugesetzt	0	0,1	0,25	0,5	0	0,1	0,5	0	0,1	0,25	0,25
% Kreatinin gefunden	0,108	0,180	0,292	0,473	0,094	0,172	0,485	0,095	0,159	0,256	0,443
Reinwerte	—	0,072	0,184	0,365	—	0,078	0,381	—	0,064	0,161	0,348
% des Zugesetzten .	—	72	74	73	—	78	76	—	64	64	70

Die Werte ohne Kreatinzusatz sind wie erwartet bedeutend höher als bei dem Versuch mit 0,5 g, sie betragen 0,094—0,108 gegenüber 0,030%. Unter sich variieren sie wenig. Auch die Ausbeuten an zugesetztem Kreatinin sind nicht sehr verschieden. Weshalb sie gerade bei der höchsten Säurekonzentration am niedrigsten sind, ist nicht ganz klar.

Wir sind hier mit den Ausbeuten nicht über 64—78% hinausgekommen. Bei zwei weitern Hefepräparaten war das Resultat ein ähnliches. Man wählte hier wieder die gewohnte Säurekonzentration 1 + 2.

Tabelle 9.

Hefeextrakte Nr. 2 und 4 bei Verarbeitung von 0,1 g.

	Nr. 2	Nr. 4
Ohne Zusatz	0,085	0,236
+ 0,5 % Kreatinin . .	0,455	0,593
Reinwerte	0,370	0,363
% Ausbeute	74	73

Obgleich der ohne Zusatz gefundene scheinbare Kreatiningehalt bei den beiden Präparaten recht verschieden ist, finden wir praktisch dieselbe Ausbeute an zugesetztem Kreatinin, 73 und 74%.

Es war nun noch eine weitere Möglichkeit zur Erklärung unserer schlechten Ausbeuten vorhanden. Kreatinin wird bei alkalischer Reaktion leicht wieder in Kreatin zurückverwandelt. Dies ist ja auch die Ursache des Ausbleichens der Kreatininreaktion beim Aufkochen. Es konnte nun sein, dass bereits beim Aufkochen unserer Abdampfrückstände mit Calciumkarbonat ein p_H auftritt, welches eine teilweise Rückbildung bewirkt.

Um dies zu prüfen, wurde beim folgenden Versuch, bei dem Vitamin-Hefeextrakt, die Calciumkarbonatbehandlung in der Kälte ausgeführt. Man filtrierte sofort, säuerte das Filtrat mit einem Tropfen n-HCl an und dampfte es ein. Man erhielt folgende Resultate:

Tabelle 10.

Behandlung des Eindampfrückstandes mit Calciumkarbonat in der Kälte.

% Kreatinin zugesetzt .	0	0,2	0,5	1,0
% Kreatinin gefunden .	0,208	0,439	0,719	1,175
Reinwerte	—	0,231	0,511	0,967
% des Zugesetzten . .	—	115	102	97

Dadurch, dass das Aufkochen mit dem Calciumkarbonat unterlassen wurde, sind die Ausbeuten nun tatsächlich auf ungefähr 100%, in einem Fall sogar darüber gestiegen. Wir können also für die frühern Verluste grossenteils die Hitzebehandlung mit Calciumkarbonat verantwortlich machen.

Im Hinblick auf die im nächsten Abschnitt zu besprechenden Ergebnisse von *Remy* wurde nun genau dieselbe Versuchsreihe derart ausgeführt, dass die in der Kälte gewonnenen Calciumkarbonatfiltrate nicht eingedampft, sondern sogleich mit Pikrinsäure und Natronlauge versetzt und nach 10 Minuten auf das gewünschte Volumen verdünnt und kolorimetriert wurden. Je 5 cm^3 Filtrat wurden mit 1,5 cm^3 Pikrinsäure und 1 cm^3 Natronlauge versetzt und dann auf 50 cm^3 verdünnt. Man fand:

Tabelle 11.

Verarbeitung des Calciumkarbonatfiltrates ohne Eindampfen.

% Kreatinin zugesetzt .	0	0,2	0,5	1,0
% Kreatinin gefunden .	0,124	0,286	0,579	1,080
Reinwerte	—	0,162	0,445	0,856
% des Zugesetzten . .	—	81	89	86

Die Ausbeuten sind wieder gesunken. Die Zeit von 10 Minuten hat somit nicht genügt, um die Reaktion in der verdünnten Lösung zu Ende zu führen, während sie, im Rückstand ausgeführt, nach 5 Minuten beendigt ist. Ob eine längere Reaktionsdauer angebracht wäre, lässt sich nicht ohne weiteres sagen, da die Farbstärke ja mit der Zeit infolge der Umwandlung von Kreatinin in Kreatin wieder abnimmt.

Auffallend ist, dass der Blindversuch bei dieser Versuchsreihe bedeutend niedriger ist als bei der vorherigen, er macht nur 60% davon aus. Dies würde nun wieder zugunsten der Ausführung der Reaktion direkt im Filtrat sprechen, da es uns bei den Hefeextrakten wichtiger ist, möglichst niedrige Blindwerte zu erhalten, als allfällige Zusätze von Fleischextrakt ganz quantitativ wiederzufinden.

6. Filtration durch Aluminiumoxyd.

Erst als die vorliegende Arbeit ungefähr an diesem Punkte angelangt war, stiess ich auf eine Arbeit von *E. Remy*[10]), in welcher zur Reinigung der mit Salzsäure behandelten Lösungen statt der Permanganatoxydation eine Filtration durch Aluminiumhydroxyd empfohlen wird, ein Adsorbens, welches Kreatin und Kreatinin nicht aufnimmt, wohl aber die färbenden Verunreinigungen.

Remy liefert eine Anzahl vergleichender Bestimmungen, die nach der Methode des Schweizerischen Lebensmittelbuches — gemeint ist offenbar die Methode von *Sudendorf* und *Lahrmann* — aber nach Filtration durch frisch gefälltes Aluminiumhydroxyd und durch Aluminiumhydroxyd Merk erhalten worden sind und findet nach der Adsorptionsmethode durchwegs etwas höhere und, wie er annimmt, richtigere Werte. Leider fehlen Beleganalysen unter Zusatz von Kreatin oder Kreatinin.

Remy dampft 100 cm³ 2%ige Fleischextraktlösung oder 5—6%ige Lösung von Suppenwürfeln mit 20 cm³ n-Salzsäure ein. Er arbeitet also mit sehr verdünnter Säure, aber bei ziemlich langer Eindampfzeit. Den Rückstand nimmt er mit 100 cm³ Wasser auf und filtriert ihn durch eine 15 cm hohe und 25 mm weite Schicht von Aluminiumhydroxyd. Dies entspricht nach meiner Wägung etwa 66 g Hydroxyd. 25 cm³ des nur noch hellgelb gefärbten Filtrates werden mit 6 cm³ Pikrinsäure-Natronlauge versetzt und nach 10 Minuten mit einer Lösung von bekanntem Kreatingehalt verglichen.

Ich verwendete für meine Versuche nicht Aluminiumhydroxyd, sondern Aluminiumoxyd, wasserfrei, standardisiert nach Brockmann. Von diesem allerdings ziemlich kostspieligen Präparat genügen halbsogrosse Mengen zur Entfärbung als sie *Remy* verwendete.

Zunächst wurden 10 cm³ einer 2%igen Lösung unseres Vitamin-Hefeextraktes Nr. 1 ohne und mit Kreatinzusatz mit Salzsäure eingedampft und

[19]) Z. U. L. **74**, 384, 1934.

der Rückstand mit 10 cm³ Wasser aufgenommen und im Reagensglas mit 2,5 g Aluminiumoxyd geschüttelt und filtriert. 5 cm³ des hellgelb gefärbten Filtrats, entsprechend 0,1 g Material, wurden mit 1,5 cm³ Pikrinsäure und 1 cm³ Natronlauge versetzt, nach 10 Minuten auf 50 cm³ verdünnt und kolorimetriert. Man fand:

Tabelle 12.

Schütteln mit Al_2O_3, Verarbeitung ohne Eindampfen.

% Kreatinin zugesetzt .	0	0,2	0,5	1,0
% Kreatinin gefunden .	0,105	0,268	0,502	0,852
Reinwerte	—	0,163	0,379	0,747
% des Zugesetzten . .	—	82	79	75

Der Ersatz des Calciumkarbonats durch das Aluminiumoxyd hat den Blindversuch von 0,124 auf 0,105, also zunächst noch nicht sehr stark herabgedrückt. Die Ausbeuten sind etwas gesunken (vgl. Tab. 11).

Man ging nun dazu über, das Aluminiumoxyd in ein Rohr von 8 mm innerm Durchmesser einzufüllen und die Lösung unter Absaugen hindurchzufiltrieren. Man verwendete 2 und 3 g Al_2O_3 und erreichte damit Schichthöhen von 5 und 7 cm. Die Filtrate waren hellgelb, aber noch etwas trüb und wurden daher auszentrifugiert. Man fand:

Tabelle 13.

Filtration durch Al_2O_3.

	Hefeextrakt Nr. 2				Hefeextrakt Nr. 4			
Angewendete g Aluminiumoxyd .	2				3			
% Kreatinin zugesetzt	0	0,2	0,5	1,0	0	0,2	0,5	1,0
% Kreatinin gefunden	0,070	0,241	0,507	0,932	0,079	0,288	0,565	1,010
Reinwerte	—	0,171	0,437	0,852	—	0,191	0,468	0,913
% des Zugesetzten	—	86	87	85	—	96	93	91

Die Wirkung ist bei der Filtration durch eine Aluminiumoxydschicht bedeutend besser als beim Schütteln mit dem Adsorbens. Wir haben bei Nr. 2 unter Verwendung von 2 g Oxyd 85—87% Ausbeute, bei Nr. 4 unter Verwendung von 3 g 91—96%. Im letztern Fall sinkt die Ausbeute auch wieder mit steigendem Zusatz.

Bei Extrakt Nr. 4 wurde nun die Adsorption ohne Kreatinzusatz mit variablen Aluminiumoxydmengen wiederholt und folgendes Resultat erhalten:

	mit 2 g	3 g	4 g Al_2O_3
% Kreatinin	0,115	0,088	0,088

2 g Oxyd ist also in diesem Fall zu wenig, mit 3 g erreicht man die maximale Adsorption, die auch bei Verwendung von 4 g nicht übertroffen wird.

Eine Vergleichung mit den Werten der Tab. 9 zeigt die adsorptive Ueberlegenheit des Aluminiumoxyds gegenüber dem früher verwendeten Calciumkarbonat besonders bei dem Hefeextrakt Nr. 2.

	mit $CaCO_3$	mit Al_2O_3
Hefeextrakt Nr. 2	0,085 %	0,070 %
» Nr. 3	0,236 %	0,088 %

In beiden Fällen bleiben so viel von den störenden Verunreinigungen, dass etwa 0,07—0,09% Kreatinin vorgetäuscht werden. Man versuchte nun, ob sich nicht auch dieser Rest noch vermindern liesse, indem man bereits die ursprüngliche Lösung des Hefeextraktes und dann später nochmals die durch Salzsäurebehandlung erhaltene durch Aluminiumoxyd filtrierte. Man verwendete zu diesem Versuch den Vitamin-Hefeextrakt Nr. 1.

50 cm³ einer 2%igen Lösung des Extraktes wurden durch 10 g Aluminiumoxyd filtriert. Je 10 cm³ des Filtrats wurden auf gewohnte Weise mit Salzsäure eingedampft und der Rückstand mit 10 cm³ Wasser aufgenommen und durch 3 g Aluminiumoxyd filtriert. Man fand:

% Kreatinin zugesetzt .	0	0,2	0,5	1,0
% Kreatinin gefunden .	0,075	0,240	0,525	0,960
Reinwerte	—	0,165	0,480	0,885
% des Zugesetzten . .	—	83	96	89

Der Blindwert ist von 0,105 (Tab. 12) auf 0,075 gesunken. Da aber der in Tab. 12 wiedergegebene Versuch nicht den optimalen Bedingungen entspricht (Schütteln mit 2,5 g Al_2O_3 statt Filtration durch eine Schicht von 3 g), kann kaum von einer wesentlichen Verbesserung gesprochen werden. Die umständliche Arbeitsweise lohnt sich nicht, besonders da auch die Ausbeuten nicht bessere geworden sind als in den letzten Versuchen.

Wir haben gesehen, dass es zwar nicht möglich ist, die störenden Stoffe in Hefeextrakten, welche Kreatinin vortäuschen, durch die Aluminiumoxyd-Adsorption vollständig zu entfernen, dass sie aber dadurch auf ein erträgliches Mass zurückgeführt werden. Aluminiumoxyd wirkt als Adsorbens entschieden besser als Calciumkarbonat und macht daher die weiter oben beschriebene Komparatormethode überflüssig. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das Reaktionsprodukt vor der Farbmessung nicht filtriert zu werden braucht, wie dies bei Verwendung von Calciumkarbonat wegen der Ausscheidung von Phosphaten beim Alkalischmachen der Lösung notwendig ist.

Die Ausbeuten an zugesetztem Kreatinin sind immer noch unbefriedigend. Es zeigte sich, dass das Eindampfen unserer Aluminiumoxyd-Filtrate nicht ganz ohne Wirkung auf das Kreatinin ist, dass auch hier, ähnlich wie beim Eindampfen der Calciumkarbonat-Filtrate eine gewisse Rückverwandlung in Kreatin erfolgt. Man dampfte die Filtrate daher im folgenden unter Zusatz von 1 bis 2 Tropfen HCl 1:1 ein. Dabei findet allerdings wieder eine ganz leichte Erhöhung der Blindwerte durch Bildung gefärbter Stoffe statt.

Es wurden nun eine Reihe von Handelsprodukten auf ihren Gehalt an Gesamt-Kreatinin geprüft. Ueberall wurden bestimmte Mengen Kreatinin in Form von Kreatin zugesetzt. Die Ausbeuten sind auf Prozente des Vorhandenen, nicht des Zugesetzten berechnet.

Tabelle 14.

Gesamtkreatinin einer Reihe von Handelsprodukten vor und nach Kreatininzusatz.

	% Gesamt-Kreatinin	% zugesetzt	% gefunden	% des Vorhandenen
Fleischextrakt . . .	6,77	5,0	11,6	98,5
Bouillonwürfel A . .	1,04	0,625	1,62	97,2
» B . .	0,985	0,625	1,54	95,8
Suppenwürze A . .	0,22	0,25	0,44	94,0
» B . .	0,24	0,25	0,45	91,8
Gänseleberpastete .	0,11	6,25	7,09	96,7
Vitamin-Hefeextrakt	0,25	0,625	0,80	88,4
Hefeextrakt 789 . .	0,136	0,625	0,72	94,6
» T. B. .	0,103	0,625	0,715	98,2
» trocken .	0,205	0,625	0,855	103 0

Die Ausbeuten sind in der Regel befriedigend.

Bei den Suppenwürzen liegen die Verhältnisse offenbar ähnlich wie bei den Hefeextrakten; man findet einen gewissen scheinbaren Kreatiningehalt, der aber von andern Stoffen herrührt.

Methodik.

Reagentien: 1,2 %ige wässrige Pikrinsäurelösung,
Salzsäure 1 : 1 (1 Vol. konz. HCl auf 2 Vol. verdünnt),
10 %ige Natronlauge,
0,5 n-Kaliumbichromat (24,54 g im l),
Aluminiumoxyd, standardisiert, nach Brockmann.

Je nach dem voraussichtlichen Gehalt an Gesamt-Kreatinin werden wechselnde Mengen Ausgangsmaterial in Arbeit genommen. Von Fleischextrakt stellt man sich Lösungen von 0,4 g in 100 cm³, von Bouillonwürfeln und Hefeextrakten solche von 4 g in 100 cm³ und von flüssigen Zubereitungen wie Suppenwürzen solche von 8 g in 100 cm³ her. Enthalten die Präparate Fett, so werden die Lösungen filtriert. Bei Fleischpasten werden 4 g Material wiederholt mit kleinen Mengen Wasser warm ausgezogen. Der Auszug wird auf 100 cm³ verdünnt, mit etwas Kieselgur geschüttelt und filtriert.

Je 5 cm³ der vorbereiteten Lösungen, entsprechend 0,02 g Fleischextrakt oder 0,2 g Bouillonwürfel oder Hefeextrakt werden mit 10 cm³ Salzsäure in einem tiefen Porzellanschälchen von etwa 7,5 cm Durchmesser auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird mit 10 cm³ Wasser aufgenommen und durch eine Schicht von 3 g Aluminiumoxyd, welches sich in einem 8 mm weiten, unten verjüngten und mit einem Wattebausch verschlossenen Glasrohr befindet, unter Absaugen durchfiltriert und das stets hellgelbe Filtrat in einem kleinen Gläschen aufgefangen. Sollte es trüb sein, so wird es auszentrifugiert oder filtriert.

5 cm³ des klaren Filtrats, entsprechend 0,01 g Fleischextrakt oder 0,1 g Suppenwürfel oder Hefeextrakt werden mit 1 Tropfen Salzsäure versetzt und in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit 1,5 cm³ Pikrinsäurelösung und 1 cm³ Natronlauge versetzt, nach dem Umrühren genau 5 Minuten stehen gelassen

und auf 50 cm^3 verdünnt. Die entstandene rotbraune Färbung wird sogleich, mindestens aber innert $^1/_2$ Stunde, im Duboscq-Kolorimeter oder im Walpolschen Komparator unter Vergleichen mit 0,5 n-Bichromatlösung kolorimetriert.

a) Im Duboscq-Kolorimeter. Die Bichromatlösung wird auf eine geeignete, zwischen 2 und 10 mm liegende Schichthöhe eingestellt und die zu prüfende Lösung damit verglichen.

Die Berechnung geschieht nach der Formel:

$$\text{mg Gesamt-Kreatinin in 50 cm}^3\text{ Lösung} = \frac{h + 2{,}3}{h_1} \cdot 0{,}787,$$

wobei h = Höhe der Bichromatschicht,
h_1 = Schichthöhe der zu prüfenden Lösung.

Falls die verwendeten 5 cm^3 Filtrat 0,1 g Ausgangsmaterial enthalten, so entsprechen die gefundenen Milligramme den Prozenten Gesamt-Kreatinin.

b) Im Komparator. Die genaue Arbeitsweise für Lösungen mit Eigenfärbung ist weiter oben angegeben. Da nach der Filtration durch Aluminiumoxyd eine störende Eigenfärbung nicht mehr in Betracht kommt, genügt es, in die linke vordere Oeffnung die zu prüfende Lösung, in die rechte vordere Oeffnung ein Reagensglas mit 4 cm^3 Wasser zu stellen und letzterem aus einer in $^1/_{100}$ cm^3 eingeteilten 1-cm^3-Präzisionspipette oder -bürette vorsichtig unter Umschwenken 0,5 n-Bichromatlösung zuzusetzen, bis die Färbungen rechts und links gleich sind. Man beobachtet dabei am besten gegen ein helles, mattiertes Fenster.

Die Berechnung geschieht nach der Formel:

$$\text{mg Gesamt-Kreatinin in 50 cm}^3\text{ Lösung} = \frac{100b - 8}{32{,}5},$$

wobei b = cm^3 0,5 n-Bichromatlösung, die zu 4 cm^3 Wasser zugesetzt worden sind.

Falls mehr Gewicht auf den qualitativen Nachweis als auf eine möglichst genaue Bestimmung gelegt wird, so etwa bei der zolltechnischen Prüfung von Hefeextrakten, so empfiehlt es sich, das nach der Filtration mit Aluminiumoxyd erhaltene Filtrat nicht einzudampfen, sondern 5 cm^3 davon direkt mit 1,5 cm^3 Pikrinsäure und 1 cm^3 Natronlauge zu versetzen, nun aber nicht 5, sondern 10 Minuten stehen zu lassen und dann zu verdünnen. Auch empfiehlt sich speziell hier die Komparatormethode oder die einfache Vergleichung mit einer Skala von Bichromatlösungen, welche bestimmten Kreatiningehalten entsprechen, in Reagensgläsern.

Falls die mit Pikrinsäure entstandene Färbung beim Aufkochen nicht abblasst und nach kurzer Zeit in die gelbe Färbung des Natriumpikrats übergeht (Vergleichen mit einer auf 50 cm^3 verdünnten Lösung von 1,5 cm^3 Pikrinsäure und 1 cm^3 Natronlauge), sondern im Gegenteil intensiver wird, so sind fremde, Kreatinin vortäuschende Stoffe zugegen.

Ein Gehalt von weniger als 0,25% Gesamt-Kreatinin bei Hefeextrakten ist nicht als von Fleischextrakt herrührend zu betrachten.

Durch Zusatz von 0,74 cm^3 Bichromatlösung zu 4 cm^3 Wasser erhält man die Färbung, welche bei der Komparatormethode 0,25% Gesamt-Kreatinin entspricht.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Berechnungsweise für die Folin'sche Kreatininbestimmung angegeben, welche gestattet, auch kleinere Bichromat-Schichthöhen als 8 mm zu benützen.
2. Es wird eine Komparatormethode angegeben, welche gestattet, die Eigenfärbung der Lösungen auszuschalten. Indem aber schliesslich die Filtration durch Aluminiumoxyd, ähnlich dem Vorschlag von *Remy* angewendet worden ist, und so sehr hellgefärbte Lösungen erhalten werden, verliert die Komparatormethode an Interesse.
3. Die Kreatininbestimmung, speziell in Hefeextrakten, wird studiert und eine Vorschrift zur Bestimmung aufgestellt, ohne dass es aber gelungen wäre, die störenden, Kreatinin vortäuschenden Stoffe ganz zu entfernen.

Bibliographie.

Einige einfache Winke für die Mehluntersuchung. E. Berliner. (Das Mühlenlaboratorium, Januar 1939, Beilage zu «Die Mühle».)

Zum Nachweis von Roggenmehl in Weizenmehl wird die wässerige Mehlsuspension filtriert, mit der doppelten Menge Aceton versetzt und ohne zu schütteln gemischt. Bei Gegenwart von Roggenmehl fallen sofort Schleimfäden aus, die sich gewöhnlich an der Flüssigkeitsoberfläche ansammeln und neben gelegentlich auch ausfallenden Eiweissflocken ohne weiteres erkennbar sind. Der Nachweis ist so empfindlich, dass noch weniger als 1% Roggenmehl erkennbar ist.

Zum mikroskopischen Nachweis von Bohnenmehl in Getreidemehlen verreibt man eine Spur Mehl in einem Tropfen Ferrum oxydatum dialysatum liquidum. Bohnenmehl erzeugt einen schon bei schwacher Vergrösserung (60- bis 80fach) deutlich erkennbaren konzentrischen Hof aus Fällungsringen des Eisensoles wie die Aleuronzellen der Getreidemehle. Beide unterscheiden sich aber dadurch, dass die Aleuronzellen stärkefrei sind und die Bohnenmehlteilchen Stärkekörner enthalten.

Zum mikroskopischen Nachweis von Maismehl in Weizen- oder anderen Mehlen eignet sich speziell folgendes Verfahren: In Mucicarminlösung, einem in der mikroskopischen Untersuchungstechnik hier und da benutzten Farbstoff, erscheinen selbst kleinste Maismehlteilchen ungefärbt zwischen den sich schnell mit dem Farbstoff durchtränkenden Mehlteilchen von Weizen,