

# Beitrag zur Kreatininbestimmung in Suppenwürzen und Bouillonpräparaten

Autor(en): **Hadorn, H.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **37 (1946)**

Heft 5-6

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983490>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

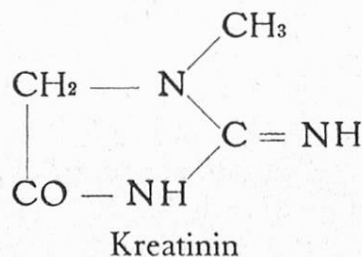
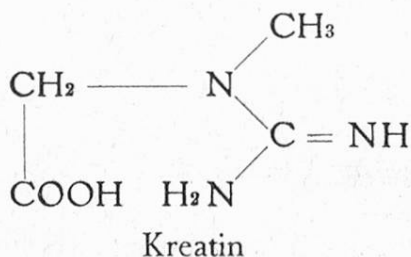
- 10) *Th. von Fellenberg*: Beitrag zur Untersuchung von Mistellen und Süssweinen, *Trav. chim. alim. et hyg.* **35**, 79 (1944).
- 11) *W. I. Baragiola et Ch. Godet*: Weine mit schwach alkalischen Aschen, *Ztschr. f. Unters. Nahrungs- u. Genussmittel* **30**, 67 (1915).
- 12) *Ch. Godet*: Contribution à l'étude de la taille de la vigne, *Annuaire agricole suisse* **1928**, 173.
- 13) *Ed. Guyot et Ch. Godet*: Le climat et la vigne, *Annuaire agricole suisse* **1935**, 39.
- 14) *E. Hugues*: *Progrès agricole* **108**, 215 (1937).
- 15) *P. Jaulmes*: Analyse des vins (Montpellier 1945).

## Beitrag zur Kreatininbestimmung in Suppenwürzen und Bouillonpräparaten

Von *H. Hadorn*

(Aus dem Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes in Bern)

Zur Bestimmung des Fleischextraktes in Bouillonpräparaten und Suppenwürzen steht uns bis heute keine geeignetere Methode zur Verfügung als seine Berechnung aus dem Gesamtkreatiningehalt, d. h. aus der Summe von Kreatin und Kreatinin, berechnet als Kreatinin. Da Fleischextrakt mindestens 5 % dieser beiden Verbindungen enthält, erfolgt seine Berechnung durch Multiplikation des Gesamtkreatinins mit 20.



Kreatinin gibt in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure eine intensive orange-rote Färbung, die sog. *Jaffé-Folinsche* Reaktion. Kreatin gibt diese Färbung nicht. Durch Eindampfen mit Salzsäure wird es aber quantitativ in Kreatinin übergeführt.

Die *Jaffé-Folinsche* Reaktion ist jedoch nicht spezifisch, da ausser Kreatinin noch viele andere Verbindungen, wie z. B. Aldehyde, Ketone, Ketosäuren und gewisse Aminosäuren mit Pikrinsäure ganz ähnliche Färbungen geben. Vor Ausführung der Farbreaktion müssen diese Kreatinin vortäuschenden Stoffe entfernt oder zerstört werden. Zur Ausschaltung dieser störenden Stoffe werden zahlreiche und sehr verschiedene Methoden vorgeschlagen. Unter anderem wurde versucht, gefärbte Verbindungen an Tierkohle, Aluminiumhydroxyd, Alumi-

niumoxyd oder an Kalziumkarbonat zu adsorbieren. Auch die Reinigung der Lösung durch Behandlung mit Bariumhydroxyd wurde vorgeschlagen. In vielen Fällen hat sich das Verfahren von *Sudendorf* und *Lahrmann*<sup>1)</sup> bewährt, bei dem die störenden Stoffe durch Behandlung mit Kaliumpermanganat in neutraler Lösung oxydiert werden. Das Verfahren eignet sich vor allem bei Produkten mit einem Zusatz von Tomatensaft, der ohne besondere Vorsichtsmassnahmen beträchtliche Mengen Kreatinin vortäuscht.

*von Fellenberg*<sup>2)</sup> hat durch zahlreiche Versuche gezeigt, dass die Kaliumpermanganat-Behandlung nicht immer den gewünschten Erfolg hat. Bei gewissen Hefepräparaten werden nach der Oxydation sogar höhere scheinbare Kreatiningehalte gefunden als vorher.

Gestützt auf eine Arbeit von *Remy*<sup>3)</sup>, der zur Entfernung der störenden Stoffe die Untersuchungsflüssigkeiten durch eine Schicht von Aluminiumhydroxyd filtrierte, arbeitete *von Fellenberg* eine Methode zur Kreatininbestimmung in Hefeextrakten und Bouillonpräparaten aus, bei welcher die störenden Stoffe an Aluminiumoxyd adsorbiert werden.

*Staub*<sup>4)</sup> hat die interessante Entdeckung gemacht, dass Bouillonpräparate und Suppenwürfel zum Teil beträchtliche Mengen Lävulinsäure enthalten, die bei der Herstellung der Produkte durch die starke Säurebehandlung aus Hexosen entstanden ist. Da Lävulinsäure gleich wie Kreatinin die *Jaffé*-Reaktion gibt und bei der Permanganatbehandlung nach *Sudendorf-Lahrmann* nicht zerstört wird, täuscht sie Kreatinin vor. *Staub* entfernt sie durch Ausschütteln der angesäuerten wässerigen Lösung mit Äther. Zur weiteren Reinigung werden noch eine Bariumhydroxyd-Behandlung und die Oxydation mit Kaliumpermanganat angeschlossen.

Auf die Zitierung der weiteren sehr umfangreichen Literatur über Kreatinin-Bestimmungsmethoden kann hier verzichtet werden, da sich in der Arbeit von *Staub* (loc. cit.) ein nahezu lückenloses Literaturverzeichnis findet. Nur eine Methode, diejenige von *v. Fellenberg*<sup>2)</sup>, die uns hier besonders interessiert, ist leider vergessen worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die genannten Methoden zu überprüfen und die gefundenen Resultate miteinander zu vergleichen. Von besonderem Interesse schien es mir, zu untersuchen, inwieweit sich ein Lävulinsäuregehalt des Präparates bei der Methode *von Fellenberg*, wo die ganze Reinigung und Vorbehandlung der Probe durch einfaches Filtrieren durch eine Aluminiumoxydschicht erfolgt, störend auswirkt. Weiter sollte versucht werden, bei der ziemlich umständlichen Methode *Staub* zwei zeitraubende Operationen, die Bariumhydroxydbehandlung und die Kaliumpermanganat-Oxydation durch die viel einfachere Aluminiumoxyd-Adsorption zu ersetzen.

Die Nachprüfung der Methode *Staub* erforderte ziemlich eingehende Versuche, weil leider in der Originalarbeit weder Beleganalysen noch Kontrollversuche angegeben werden.

## Experimentelles

Zunächst wurden eine Anzahl Handelsprodukte nach den 3 Methoden analysiert und die Resultate miteinander verglichen.

### I. Methode Sudendorf und Lahrmann

Die Methode wurde genau nach der Vorschrift des Lebensmittelbuches<sup>5)</sup> durchgeführt. Die kolorimetrische Messung erfolgte sowohl im Duboscq Kolorimeter als auch im Pulfrich Stufenphotometer.

### II. Methode Staub

Nach der Vorschrift von *Staub* wird mit bedeutend grössern Mengen gearbeitet als notwendig ist. Der Verbrauch an Reagenzien ist daher auch beträchtlich. Für eine Einzelbestimmung werden beispielsweise 480 cm<sup>3</sup> Äther verbraucht. Einfacher und rascher kommt man bei mindestens der gleichen Genauigkeit zum Ziel, wenn man mit kleineren Mengen arbeitet und statt im Schütteltrichter in einem geräumigen Reagensglas mit Äther ausschüttelt. Statt 500 cm<sup>3</sup> Reaktionsmischung bereitete ich nur 50 cm<sup>3</sup> vor, was zur kolorimetrischen Messung vollständig genügt.

Ich arbeitete zunächst nach folgender etwas modifizierter Vorschrift, wobei aber alle Konzentrationen und Verhältnisse genau der Methode *Staub* entsprechen:

#### Methodik

Reagenzien    Bariumhydroxyd kalt gesättigt  
                  1%iges Kaliumpermanganat, enthaltend 2,5 % Kochsalz  
                  3%iges Wasserstoffsuperoxyd, enthaltend 1 % Essigsäure

2 bis 3 g Substanz werden in ca. 30 cm<sup>3</sup> heissem Wasser gelöst. Nach dem Erkalten wird durch ein Wattebäuschchen vom ausgeschiedenen Fett abfiltriert, gut ausgewaschen und das Filtrat im Messkolben auf 50 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. 5 cm<sup>3</sup> des mehr oder weniger klaren Filtrates werden mit 2—3 Tropfen n-Schwefelsäure angesäuert und in einem geräumigen Reagensglas 6 mal mit je 5 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt. Zur Sicherheit wird das Reagensglas mit einem Gummistopfen verschlossen. Beim Ausschütteln wird aber darauf geachtet, dass womöglich nicht Flüssigkeit bis zum Gummistopfen verspritzt wird. Der Äther wird mit einer lang ausgezogenen Saugpipette abgesaugt. Nach 6maligem Ausäthern wird die wässrige Lösung mit n-Natronlauge neutralisiert und mit 1 cm<sup>3</sup> Bariumhydroxydlösung kräftig geschüttelt. Nach dem Absitzen des Niederschlages wird durch ein kleines Papierfilter filtriert und bis zur Chlorfreiheit des durchfliessenden Waschwassers ausgewaschen. Das Filtrat wird hierauf in einem Glasschälchen mit 1,5 cm<sup>3</sup> n-Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen und unter Tüpfeln auf Lackmuspapier mit Natronlauge genau neutralisiert. Dann wird tropfenweise Kaliumpermanganat-Kochsalz-Lösung bis zur Malagafärbung zugesetzt. Der Permanganatüberschuss wird mit einigen Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entfernt. Nach kurzem Erwärmen auf dem Wasserbad wird der ausgeschiedene Brauneisenstein abfiltriert, gut ausgewaschen und das Filtrat nach Zusatz von 1 Tropfen HCl 1 : 1 auf dem Wasserbad auf ca. 2 cm<sup>3</sup> eingengt. Nach dem Erkalten wird mit 1,5 cm<sup>3</sup> gesättigter Pikrinsäurelösung und 1 cm<sup>3</sup> 10%iger NaOH versetzt und nach genau 5 Min. auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt und die Lösung kolorimetriert.



Auf einige Fehlerquellen sei noch besonders hingewiesen:

1. Die Behandlung mit  $\text{KMnO}_4$  darf nur in der genau neutralisierten Lösung und nur mit einem geringen Überschuss erfolgen, weil sonst Kreatinin zerstört wird.

2. Das Einengen des Filtrats der Braunsteinfällung muss in saurer Lösung erfolgen, weil sonst Kreatinin teilweise in Kreatin übergehen und so der Bestimmung entzogen würde, wie folgende Zahlen zeigen:

Je  $30 \text{ cm}^3$  reiner Kreatininlösung wurden auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft.

salzsaure Lösung eingedampft	gefunden: $0,250 \text{ mg} = 100 \%$
neutrale Lösung	gefunden: $0,232 \text{ mg} = 93 \%$

3. Beim Verdünnen der Pikratlösung wurden fast ausnahmslos mehr oder weniger trübe Lösungen erhalten. Diese müssen, besonders wenn im Stufenphotometer gearbeitet wird, vor der kolorimetrischen Messung auszentrifugiert werden, weil trübe Lösungen mehr Licht absorbieren und zu dunkle Färbungen vortäuschen.

### III. Methode von Fellenberg

Die Methode wurde zunächst in der von *von Fellenberg* angegebenen Form angewendet.

#### Methodik

$5 \text{ cm}^3$  der vom Fett befreiten 4%igen Lösung werden mit  $10 \text{ cm}^3$   $\text{HCl}$  1:1 versetzt und in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit  $10 \text{ cm}^3$  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 schwachem Absaugen durchfiltriert.  $5 \text{ cm}^3$  des klaren, meist nahezu farblosen Filtrats werden mit 1 Tropfen  $\text{HCl}$  versetzt und auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit  $2 \text{ cm}^3$  Wasser,  $1,5 \text{ cm}^3$  gesättigter Pikrinsäurelösung und  $1 \text{ cm}^3$  10%iger  $\text{NaOH}$  versetzt, nach dem Umrühren genau 5 Minuten stehen gelassen und auf  $50 \text{ cm}^3$  verdünnt. Die Färbung wird im Duboscq Kolorimeter oder im Pulfrich Stufenphotometer kolorimetriert.

#### Diskussion der verschiedenen Methoden

Die nach den 3 Methoden gefundenen Kreatininwerte einer Anzahl verschiedener Handelsprodukte sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Zusammenfassend ergibt sich folgendes:

1. Nach der Methode *Sudendorf* und *Lahrman* findet man die höchsten und am wenigsten gut reproduzierbaren Werte. Wie schon aus den zitierten Arbeiten hervorgeht, sind sie sehr oft falsch.

2. Die nach Methode *Staub* und Methode *von Fellenberg* erhaltenen Werte stimmen unter sich meist recht gut überein und sind ziemlich genau reproduzier-

**Tabelle 1**  
*Analyse von Suppenwürzen und Bouillonpräparaten*

	Produkt	Wassergehalt %	Lävulinsäure %	Kreatininbestimmung nach verschiedenen Methoden			
				I Methode <i>Sudendorf-Lahrmann</i> 1. mit HCl eindampfen 2. KMnO <sub>4</sub> -Oxydation	II Methode <i>Staub</i> 1. Ausäthern 2. Ba(OH) <sub>2</sub> -Behandlg. 3. mit HCl eindampfen 4. KMnO <sub>4</sub> -Oxydation	III Methode <i>v. Fellenberg</i> 1. mit HCl eindampfen 2. Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Filtration	IV neue Methode 1. mit HCl eindampfen 2. Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Filtration 3. Ausäthern
1	Ochsenchwanzsuppe (Lu)	12,1	2,14 1,91	0,33	0,282 0,295	0,244 0,241	0,219 0,219
2	Hühnerbrühe (Lu)	11,3	1,25	0,26	0,189 0,209	0,199	0,186
3	Ochsenfleischbrühe (Sch)	12,2	0,91	—	0,279	0,260 0,253	0,229 0,238
4	Hühnerbrühe (Sch)	12,4	1,03	—	0,264	0,237	0,231
5	Fleischbrühe (T)	11,1	2,18	0,47	0,430 0,415	0,421 0,408	0,399 0,384
6	Fleischbrühe (R)	11,6	0,88	0,43 0,38	0,373	0,325 0,313 0,397 0,393	0,316 0,312 0,314 0,316
7	Fleischsuppe (M)	5,2	1,06	—	0,468	0,454	0,452
8	Fleischsuppe K)	3,9	0,91	—	—	0,425	0,424
9	Bouillonwürfel (K)	8,7	0,76	—	—	0,472	0,460
10	Bouillonwürfel (M)	11,5	0,57	—	—	0,569	0,569
11	Suppenbouillonwürfel (Lieb.)	5,6	1,03	—	0,554	0,514	0,514
12	Suppenwürze (M)	53,6	1,23 1,26	0,13	0,141	0,084 0,079	0,076 0,073
13	Suppenwürfel aus Soya (T)	—	2,01 2,36	0,13	0,169	0,050 0,052	0,037 0,052
14	Würfel aus Pflanzenextrakt (T)	12,8	1,70	0,14	0,137	0,049 0,053	0,031 0,037
15	Vitaminwürze (Cen.)	34,1	0,53 0,47	0,27 0,30	0,194	0,070 0,061	0,059 0,053

bar. Nach Methode *von Fellenberg* werden fast immer etwas niedrigere Werte gefunden. Hinsichtlich Genauigkeit sind Methode *Staub* und Methode *von Fellenberg* etwa gleichwertig. Die Methode *von Fellenberg* ist aber viel einfacher und rascher durchführbar. Auch werden immer vollkommen klare Pikratlösungen erhalten, die sich sehr genau im Pulfrich Photometer messen lassen.

3. Bei fleischextraktfreien Präparaten findet man sowohl nach der Methode *Sudendorf* und *Lahrman* als auch nach der Methode *Staub* beträchtliche scheinbare Kreatiningehalte. Nach der Methode *von Fellenberg* werden hier viel niedrigere Werte gefunden.

#### IV. Ausarbeitung einer neuen Aluminiumoxyd-Äther-Methode

Es sollte nun untersucht werden, in welchem Ausmass ein bestimmter Lävulinsäuregehalt des Untersuchungsmaterials die Kreatininbestimmung nach der Methode *von Fellenberg* stört.

In analoger Weise, wie bei der Methode *Staub*, wurden 5 cm<sup>3</sup> der angesäuerten Lösung des Untersuchungsmaterials zur Entfernung der vorhandenen Lävulinsäure zunächst 6 mal mit je 5 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt. Dann wurden 10 cm<sup>3</sup> HCl 1 : 1 zugegeben und auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in 10 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen und durch eine Schicht von Aluminiumoxyd filtriert. In 5 cm<sup>3</sup> des Filtrats wurde nach dem Einengen auf dem Wasserbad das Kreatinin bestimmt. Die gefundenen Resultate waren in der Regel bei Anwendung der Äthermethode etwas niedriger als bei der analogen Methode ohne Ätherextraktion.

Es wurde nun beobachtet, dass in einer ausgeätherten, lävulinsäurefreien Bouillonlösung nach dem Eindampfen mit Salzsäure wiederum Lävulinsäure nachweisbar war. Offenbar wird bei der starken Salzsäurebehandlung neue Lävulinsäure gebildet, vermutlich aus Kohlehydraten oder deren Zersetzungsprodukten, die sich im Bouillonpräparat vorfinden. Daher wurde die Methode so abgeändert, dass die Ätherextraktion erst nach dem Eindampfen mit Salzsäure, also in 5 cm<sup>3</sup> der durch Aluminiumoxyd filtrierten Lösung, ausgeführt wurde. Das nachstehende Beispiel zeigt, dass dabei tatsächlich etwas niedrigere Resultate erhalten werden.

#### Fleischbrühe Nr. 6

	Versuch I	Versuch II
Methode von Fellenberg (ohne Ausäthern)	0,397 ‰	0,393 ‰
Erst ausgeäthert, dann mit HCl eingedampft und durch Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> filtriert	0,343 ‰	0,354 ‰
Erst mit HCl eingedampft, dann durch Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> filtriert und ausgeäthert	0,314 ‰	0,316 ‰



Bei allen weitem Versuchen wurde analog vorgegangen: Zunächst wurde mit HCl eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und durch eine Schicht von Aluminiumoxyd filtriert. Ein aliquoter Teil des Filtrats wurde mit Äther ausgeschüttelt. Die endgültige Vorschrift wird am Schluss dieser Arbeit angegeben.

### *Überprüfung der Methode*

Die Methode wurde nun folgendermassen auf ihre Zuverlässigkeit und Brauchbarkeit geprüft:

#### *a) Filtrieren von reiner Kreatininlösung durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*

Remy hat gezeigt, dass Kreatinin an Aluminiumhydroxyd nicht adsorbiert wird. Ich stellte einen entsprechenden Kontrollversuch mit dem zu meinen Versuchen verwendeten Aluminiumoxyd, «standardisiert zur Adsorptionsanalyse nach Brockmann», an. 15 cm<sup>3</sup> Lösung, enthaltend 0,750 mg Kreatinin, wurden durch eine Schicht von 3 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert. In je 5 cm<sup>3</sup> des Filtrats wurden 0,1250 und 0,1252, in 5 cm<sup>3</sup> nicht filtrierter Lösung ebenfalls 0,1250 mg Kreatinin gefunden. Kreatinin wird also an Aluminiumoxyd nicht adsorbiert.

#### *b) Zusatz bekannter Mengen Kreatinin zu Würzen und Bouillonpräparaten*

Zu je 5 cm<sup>3</sup> der 5—6%igen wässrigen Lösung verschiedener Präparate wurden vor der Analyse bekannte Mengen Kreatinin zugesetzt und hierauf das Gesamtkreatinin nach der neuen Methode bestimmt. Die gefundenen Resultate sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

*Tabelle 2*  
*Kreatininzusatz zu verschiedenen Präparaten*

Präparat	Ochsen- fleischbrühe Nr. 5	Fleisch- brühe Nr. 6	Suppen- würze Nr. 12	Würze aus Pflanzen- extrakt Nr. 14
Kreatiningehalt %	0,39	0,31	0,08	0,03
in 5 cm <sup>3</sup> Lsg. vorhanden    mg	1,076	0,810	0,262	0,099
Kreatinin zugesetzt        mg	0,500	1,250	0,500	0,500
Summe                            mg	1,576	2,060	0,762	0,599
gefunden Gesamtkreatinin mg	1,560	2,010	0,742	0,595
gefunden in % des vorhandenen	99,0	97,6	97,4	99,3

Bei allen Produkten, sowohl bei den fleischextrakthaltigen Bouillonpräparaten, wie auch bei den Würzen aus reinem Pflanzenextrakt wurde das zugesetzte Kreatinin annähernd quantitativ wieder gefunden. Die kleinen Verluste liegen nahezu innerhalb der Fehlergrenze der kolorimetrischen Methode. Die Zuverlässigkeit der Methode scheint nach diesen Ergebnissen gesichert zu sein.



### c) Permanganatoxydation nach der Aluminiumoxydfiltration

Eine Bouillonlösung (Nr. 6) wurde nach dem Filtrieren durch Aluminiumoxyd nach der Vorschrift von *Sudeñdorf* und *Lahrmann* mit Kaliumpermanganat behandelt. Das Resultat wurde dabei nicht verändert, woraus wir schliessen können, dass alle störenden oxydierbaren Stoffe bereits vom Aluminiumoxyd zurückgehalten wurden. Die Lävulinsäure wurde hingegen weder durch die Aluminiumoxyd-Filtration noch durch die Permanganat-Behandlung vollständig entfernt. Erst nach dem Ausäthern wurden niedrigere Kreatininwerte gefunden, wie die nachstehenden Zahlen zeigen:

	I	II
Nach $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Filtration	0,397 ‰	0,393 ‰
Nach $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Filtration und $\text{KMnO}_4$ -Behandlung	0,394 ‰	0,394 ‰
Nach $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Filtration und Ausäthern	0,314 ‰	0,316 ‰

### Vergleich der Aluminiumoxyd-Äther-Methode mit den andern Methoden

Die neue Methode, wie sie in der endgültigen Vorschrift am Schluss dieser Arbeit angegeben wird, wurde nun an 15 verschiedenen Handelsprodukten ausprobiert und die Resultate mit den nach den andern Methoden erhaltenen verglichen (Tabelle 1).

Bei Parallelbestimmungen mit wechselnden Einwaagen liefert sie sehr gut übereinstimmende Werte. Diese sind durchwegs etwas niedriger als die nach den andern Methoden gefundenen.

Gegenüber der Methode von *Fellenberg*, von der sie sich nur durch die Ätherextraktion unterscheidet, ist die Differenz oft sehr gering. Diese wird einzig durch die in der Versuchslösung vorhandene Lävulinsäure bedingt. Der Lävulinsäuregehalt des Untersuchungsmaterials wurde nach der von *Staub*<sup>6)</sup> angegebenen Vorschrift bestimmt und ist in der Tabelle 1 ebenfalls angegeben. Wie später experimentell gezeigt werden wird, täuscht 1 ‰ Lävulinsäure ca. 0,032 ‰ Kreatinin vor. Zwischen dem Lävulinsäuregehalt des Präparats und der Verminderung des Kreatininwerts durch das Ausäthern besteht jedoch kein deutlicher Zusammenhang. Diese Tatsache wird dadurch erklärt, dass bei der starken Salzsäurebehandlung der Proben ein Teil der vorhandenen Lävulinsäure zerstört wird. Andererseits kann in gewissen Produkten, die Kohlehydrate oder deren Zersetzungsprodukte enthalten, beim Eindampfen mit Salzsäure eine beträchtliche Menge Lävulinsäure gebildet werden. In der Tabelle 3 sind einige Beispiele angegeben.

Diese Versuche zeigen, dass zur vollständigen Ausschaltung der Lävulinsäure erst nach dem Eindampfen mit Salzsäure ausgeäthert werden darf. Die gelegentlich auftretenden erheblichen Differenzen im Kreatiningehalt zwischen Parallelbestimmungen nach der Methode von *Fellenberg* sind zum Teil auf ungleichmässige Bildung und Zersetzung der Lävulinsäure während der Salzsäure-

Tabelle 3

Veränderung des Lävulinsäuregehalts beim Eindampfen mit HCl

	im ursprünglichen Produkt vor dem Eindampfen	nach Eindampfen mit 10 cm <sup>3</sup> HCl 1:1	
		gefunden	in % des urspr. Gehalts
Reine Lävulinsäurelösung	10,0 mg	5,30 mg	55 %
Reine Lävulinsäurelösung	5,0 mg	2,80 mg	56 %
Nr. 1 Ochsenchwanzsuppe	2,14 %	1,45 %	68 %
Nr. 12 Maggis Suppenwürze	1,26 %	0,83 %	66 %
Nr. 13 Suppenwürfel aus Soya	2,37 %	1,31 %	55 %
Nr. 14 Texton Suppenwürfel aus Pflanzenextrakt	1,69 %	1,05 %	62 %
Nr. 15 Cenovis Würze	0,53 %	1,21 %	229 %

behandlung zurückzuführen, wobei möglicherweise die Verdampfungsgeschwindigkeit eine gewisse Rolle spielt. Zum Teil werden sie auch durch eine oft beträchtliche, jedoch ungleichmässige Adsorption von Lävulinsäure an Aluminiumoxyd bedingt. Bei der Äthermethode, wo nur Kreatinin bestimmt wird, sind diese Unterschiede nicht mehr vorhanden, wie die nachstehenden Werte aus 5 von einander unabhängigen Serien des gleichen Untersuchungsmaterials zeigen.

Fleischbrühe Nr. 6

Methode von <i>Fellenberg</i>	0,325	0,313	0,397	0,393	0,381 *
neue Methode	0,316	0,312	0,314	0,316	0,315 *

Die untereinander stehenden Werte beziehen sich jeweils auf die gleiche Einwaage. Bei den letzten, mit \* bezeichneten Versuchen wurde vor der Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Filtration ein Zusatz von 4,5 % Lävulinsäure gemacht.

In fleischextraktfreien, sog. vegetabilischen Suppenwürfeln und Hefeextrakten (Nr. 12 bis 15) findet man nach der neuen Aluminiumoxyd-Äther-Methode nur sehr niedrige scheinbare Kreatiningehalte (0,03 — 0,07 %). Nach der Methode *Staub* und Methode *Sudendorf* und *Lahrman* werden in den gleichen Produkten 2—3 mal höhere Werte gefunden. Diese Blindwerte sind wahrscheinlich auf Eiweissabbauprodukte zurückzuführen. Nach *Mohler* und *Helberg*<sup>7)</sup> geben auch einige Aminosäuren, z. B. Glykokoll bzw. Diketopiperazin sowie Histidin und Arginin die *Jaffé-Folinsche* Reaktion und können Kreatinin vor-täuschen. Geringe «Kreatiningehalte» von ca. 0,05 % lassen also keineswegs auf Fleischextrakt schliessen.

## *Versuche mit andern Adsorptionsmitteln*

Da das Aluminiumoxyd «standardisiert nach Brockmann» gegenwärtig nicht mehr erhältlich ist, wurde versucht, die Reinigung durch andere Adsorptionsmittel vorzunehmen. Von den andern Präparaten unterscheidet sich das erwähnte Aluminiumoxyd vor allem durch seine günstige, nicht zu feine Korngrösse. Es lässt sich deshalb leicht in das Rohr einfüllen, und die Lösungen filtrieren rasch durch die Schicht hindurch.

### *a) Aluminiumhydroxyd*

Versuchsweise wurden nun Lösungen statt durch eine Schicht von Aluminiumoxyd durch eine solche von reinem Aluminiumhydroxyd filtriert. Dieses Präparat war aber ganz ungeeignet. Während sich beim Filtrieren durch  $\text{Al}_2\text{O}_3$  zu oberst eine dunkelbraune Zone bildet, in der die Verunreinigungen zurückgehalten werden, und die darunter liegenden Schichten rein weiss bleiben, färbte sich die ganze  $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Schicht gleichmässig hellbraun an. Die abfliessende Lösung war trotz des sehr langsamen Filtrierens noch ziemlich stark gefärbt. Nach meinen Versuchen führt die Filtration durch Aluminiumhydroxyd nur zu einer sehr unvollkommenen Reinigung. Auch Remy<sup>3)</sup> hat nach seiner Adsorptionsmethode an  $\text{Al}(\text{OH})_3$  sogar höhere Werte gefunden als nach der Methode des Lebensmittelbuches 3. Auflage, wo die Kreatininbestimmung ohne jegliche Reinigung der Lösung ausgeführt wurde.

### *b) Selbst hergestelltes Aluminiumoxyd*

Durch kräftiges Glühen von Aluminiumhydroxyd in einer flachen Platinschale wurde ein Aluminiumoxyd dargestellt. Dieses Präparat hat sich gut bewährt. Es war zwar etwas feinkörnig und die Lösungen filtrierten bedeutend langsamer hindurch als durch das  $\text{Al}_2\text{O}_3$  «standardisiert nach Brockmann», aber die Reinigung war ebenso gut. Man ist also nicht auf die Verwendung einer ganz bestimmten Sorte von Aluminiumoxyd angewiesen.

### *c) Regeneriertes Aluminiumoxyd*

Durch gründliches Auswaschen mit ca. 20/oiger Salpetersäure und anschließendem Glühen wurde das gebrauchte Aluminiumoxyd regeneriert. Dieses war ebenso wirksam wie das ursprüngliche Präparat.

### *d) Kalziumkarbonat*

Das Filtrieren der Untersuchungsflüssigkeit durch eine Schicht von Kalziumkarbonat wurde versucht, in der Hoffnung, gleichzeitig auch die Lävulinsäure entfernen zu können. Die Lösung filtrierte aber nur sehr langsam durch die Schicht des sehr feinkörnigen, gefällten Kalziumkarbonats und die Reinigung war weniger gut als beim Filtrieren durch Aluminiumoxyd. Die Lävulinsäure wurde nicht zurückgehalten, was wohl damit zusammenhängt, dass ihr Kalziumsalz leicht löslich ist.



## Versuche zur Entfernung der Lävulinsäure durch Adsorption

Um die etwas umständliche Operation des mehrmaligen Ausätherns zu umgehen, wurde versucht, auch die Lävulinsäure durch Adsorption zu entfernen.

Wie bereits mitgeteilt wurde, schlug der Versuch, die Lävulinsäure an Kalziumkarbonat zu adsorbieren, fehl.

Bei Versuchen mit gebrauchtem und wieder regeneriertem Aluminiumoxyd wurde die Beobachtung gemacht, dass ein mit verdünnter Salpetersäure ausgewaschenes und geglühtes Aluminiumoxyd wirksamer ist als das ursprüngliche Präparat «standardisiert nach Brockmann». Im Gegensatz zu diesem adsorbiert es auch die Lävulinsäure quantitativ aus reiner wässriger Lösung.

Die nachstehenden Versuche in Tabelle 4 geben Anhaltspunkte über die Wirksamkeit der verschiedenen Präparate. Durch eine Schicht von je 3 g des Adsorptionsmittels wurden 15 cm<sup>3</sup> einer reinen, wässrigen Lävulinsäurelösung filtriert und in je 5 cm<sup>3</sup> des Filtrats die Lävulinsäure bestimmt.

**Tabelle 4**  
*Adsorption der Lävulinsäure an verschiedenen Sorten von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*

	Präparat	urspr. vorhanden : mg Lävulinsäure in 5 cm <sup>3</sup>	im Filtrat: Lävulinsäure in % des urspr. Gehalts
1.	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> «standardisiert nach Brockmann»		
	1. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	1,16	52 %
	2. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	1,16	32 %
	1. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	31,6 %
	2. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	23,0 %
2.	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> «nach Brockmann» geglüht		
	1. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	27,8 %
	2. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	23,9 %
3.	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> «nach Brockmann» regeneriert		
	1. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	0
	2. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	0
4.	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> hergestellt durch Glühen von Al(OH) <sub>3</sub>		
	1. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	69,7 %
5.	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> wie Nr. 4 aber regeneriert		
	1. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	5,5 —
	2. Fraktion 5 cm <sup>3</sup>	10,0	29,5 %



Vom gewöhnlichen Aluminiumoxyd «standardisiert nach Brockmann» werden je nach den Versuchsbedingungen 48 bis 77 % der vorhandenen Lävulinsäure adsorbiert. Das mit Salpetersäure behandelte und geglühte Präparat ist viel wirksamer. Ein durch entsprechende Behandlung aus obigem Präparat dargestelltes «aktiviertes» Aluminiumoxyd adsorbierte die Lävulinsäure quantitativ. Ein anderes, aus Aluminiumhydroxyd dargestelltes Aluminiumoxyd verhielt sich ähnlich, war aber früher erschöpft.

Zur Prüfung, ob sich die Lävulinsäure auch aus Suppenwürzen und Bouillonpräparaten durch einfaches Filtrieren durch eine Schicht von aktiviertem Aluminiumoxyd entfernen lasse, wurden die entsprechenden Lösungen teils vor dem Eindampfen mit Salzsäure, teils erst nach dieser Operation, d. h. unmittelbar vor der Aluminiumoxyd-Filtration mit bekannten Mengen Lävulinsäure versetzt. In einem aliquoten Teil des Filtrats wurde die Kreatininbestimmung direkt vorgenommen, in einem andern Teil dagegen erst nach dem Ausäthern. Aus den Zahlen der Tabelle 5 ergibt sich, dass bei höheren Lävulinsäuregehalten weder die Filtration durch gewöhnliches noch durch aktiviertes Aluminiumoxyd aus-

Tabelle 5

Produkt	filtriert durch Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Sorte	zugesetzte Lävulinsäure		gefunden % Kreatinin		1 % Lävulinsäure täuscht vor: % Kreatinin
		mg in 5 cm <sup>3</sup> Lösung	in % der Einwaage	vor dem Ausäthern	nach dem Ausäthern	
<i>I. Lävulinsäurezusatz vor HCl-Behandlung</i>						
Fleischbrühe Nr. 6	Brockmann	3,33	4,75	0,363	0,316	0,010
	regeneriert	3,33	4,75	0,352	0,304	0,010
Suppenwürze Nr. 12	Brockmann	3,33	1,56	0,102	0,073	0,019
	regeneriert	3,33	1,56	0,095	0,073	0,014
<i>II. Lävulinsäurezusatz nach HCl-Behandlung</i>						
Fleischbrühe Nr. 6	Brockmann	10,0	13,7	0,571	0,325*	0,018
	regeneriert	10,0	13,7	0,561	0,324*	0,017
	Brockmann	3,33	4,56	0,386	0,316	0,015
	regeneriert	3,33	4,56	0,381	0,315	0,014
Suppenwürze Nr. 12	Brockmann	10,0	5,13	0,154	0,073	0,016
	regeneriert	10,0	5,13	0,150	0,073	0,015
	regeneriert	3,33	1,74	0,104	0,071	0,019

\* Die Lävulinsäure ist nicht quantitativ ausgeäthert worden, daher sind die beiden Kreatininwerte etwas zu hoch.

reicht, um die Lävulinsäure nur annähernd quantitativ zu entfernen. Durch die andern Verunreinigungen des Präparats wird das Adsorptionsvermögen des Aluminiumoxyds stark vermindert. Das regenerierte Aluminiumoxyd war auch bei diesen Versuchen etwas wirksamer als das ursprüngliche Präparat «standardisiert nach Brockmann».

In der letzten Spalte der Tabelle 5 wird angegeben, welche Kreatininmengen in dem betreffenden Versuch von je 1 % zugesetzter Lävulinsäure vorgetäuscht wurde. Diese schwankt zwischen 0,010 — 0,019 %.

Wie auf S. 359 gezeigt wird, täuscht 1 % Lävulinsäure in Wirklichkeit 0,032 % Kreatinin vor, woraus sich ergibt, dass beim Filtrieren durch Aluminiumoxyd immerhin beträchtliche Mengen Lävulinsäure zurückgehalten wurden.

*Um zuverlässige Analysenresultate zu erhalten, ist das Ausäthern der Lösung nach dem Filtrieren durch Aluminiumoxyd unerlässlich.*

## Kolorimetrische Messungen

### I. Kreatininbestimmung

#### a) Messung im Duboscq Kolorimeter

Nach der Vorschrift des LB IV S. 98 wird die Kreatinin-Pikrinsäure-Färbung im Duboscq Kolorimeter gegen eine 8 mm hohe Schicht von 0,5 n-Bichromatlösung kolorimetriert. Bei niedrigen Kreatiningehalten, wo nur schwache Färbungen erhalten werden, wird die Messung bei dieser Schichthöhe ungenau. *von Fellenberg* (loc. cit.) hat eine Formel abgeleitet, die die Berechnung des Kreatiningehalts bei Messungen gegen 0,5 n-Bichromatlösung beliebiger Schichtdicke erlaubt. Sie lautet:

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

$h$  = Höhe der Bichromatschicht in mm,

$h_1$  = Schichthöhe der zu prüfenden Lösung in mm.

Durch zahlreiche Versuche \*) wurde die Brauchbarkeit dieser Formel bewiesen.

Bei vergleichenden Messungen derselben Lösungen einerseits im Duboscq Kolorimeter, andererseits im Pulfrich Photometer habe ich gute Übereinstimmung erhalten. Bei nicht ganz klaren Lösungen, wie sie nach der Methode *Sudendorf* und *Lahrman* und nach der Methode *Staub* sehr oft erhalten werden,

---

\*) Anmerkung: In der Tabelle 1 auf S. 223 ist irrtümlicherweise  $h$  in cm statt in mm angegeben. Alle Werte für  $h$  sind mit 10 zu multiplizieren.

ist das Duboscq Kolorimeter vorzuziehen, weil im Pulfrich Stufenphotometer zu hohe Werte gefunden werden, wie die nachstehenden Beispiele zeigen:

	Pulfrich	Duboscq
1. Lösung trüb	0,266 ‰	0,249 ‰
2. Lösung trüb	0,242 ‰	0,212 ‰
3. Lösung leicht trüb	0,291 ‰	0,274 ‰
4. Lösung leicht trüb	0,410 ‰	0,384 ‰
5. Lösung fast klar	0,203 ‰	0,206 ‰
6. Lösung vollständig klar	0,258 ‰	0,252 ‰

### b) Messung im Pulfrich Stufenphotometer

Das Arbeiten mit dem Stufenphotometer ist bequemer und für das Auge weniger ermüdend als mit den meisten andern Kolorimetern. Ausserdem ist die Einstell- und Ablesegenauigkeit hier am grössten, weshalb dieses Instrument für die Kreatininbestimmung mehrfach empfohlen worden ist. *Kassel*<sup>8)</sup> empfiehlt das Filter S 53, *Riffart und Keller*<sup>9)</sup> verwenden das Filter S 50.

Um die Wirkung der verschiedenen Filter zu studieren, wurde eine Absorptionskurve aufgenommen.

0,50 mg Kreatinin wurden in gewohnter Weise mit Pikrinsäure in Reaktion gebracht und die Lösung mit Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt. Die Lichtabsorption wurde mit den verschiedenen Spektralfiltern gemessen. Die Kurve I in Figur 1 zeigt die Absorptionskurve der Reaktionsmischung bei der Messung gegen Wasser als Vergleichslösung. Kurve II gibt die Absorptionskurve bei der Messung gegen eine Pikrinsäure-Natronlauge-Mischung gleicher Zusammensetzung,

aber ohne Kreatinin wieder. Sie entspricht dem wirklichen Absorptionsspektrum des Kreatininpikrats. Ein Absorptionsmaximum liegt vermutlich zwischen 4700 und 5000 Å. Kurve III zeigt das Absorptionsspektrum der Natriumpikrat-Vergleichslösung, gemessen gegen Wasser. Mit Filter S 47 ist die Absorption der Kreatinin-Reaktionsmischung am grössten. Gleichzeitig absorbiert in diesem Gebiet auch die Pikratlösung ziemlich stark. Da nun in jeder Kreatinin-Reaktions-

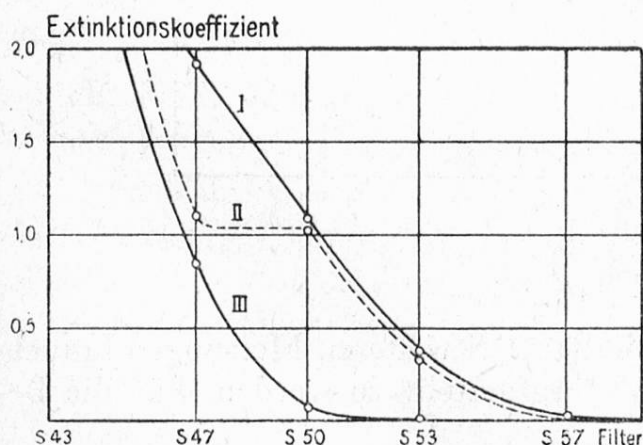


Fig. 1

mischung überschüssiges Natriumpikrat, und zwar je nach dem Kreatiningehalt in wechselnden Mengen vorkommt, ist dieses Filter für die Messung ungeeignet. Mit Filter S 50 ist die Absorption des Kreatininpikrats ebenfalls stark, während die Natriumpikratlösung nur noch sehr schwach absorbiert. Dieses Filter ist



daher für die Messung am besten geeignet. Mit Filter S 53 ist die Lichtabsorption viel geringer und die Messung würde, vor allem bei niedrigen Kreatin Gehalten, ungenauer. Bei allen Versuchen wurde daher die Extinktion unter Verwendung des Filters S 50 gegen eine Natriumpikratlösung gleicher Zusammensetzung gemessen.

### Eichkurve

Zur Ermittlung der *Eichkurve* wurden steigende Mengen einer 25 mg-%igen Kreatininlösung in kleine Porzellanschälchen abpipettiert, mit 10 cm<sup>3</sup> HCl 1 : 1 versetzt und auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Nach dem Erkalten wurde der Rückstand mit 2 cm<sup>3</sup> Wasser, 1,5 cm<sup>3</sup> gesättigter Pikrinsäurelösung und 1 cm<sup>3</sup> 10%iger NaOH versetzt. Nach dem Umrühren wurde 5 Minuten stehen gelassen, dann mit Wasser auf genau 50 cm<sup>3</sup> verdünnt und sofort gegen eine gleichzeitig bereitete Natriumpikratlösung gleicher Konzentration photometriert. Die gefundenen Werte sind in der Tabelle 5 zusammengestellt. Die Eichkurve (Figur 2) verläuft von den niedrigsten Werten bis 1 mg linear. Oberhalb 1 mg biegt sie ab, wahrscheinlich weil die zugesetzte Pikrinsäure (18 mg) nicht mehr ganz ausreichend ist.

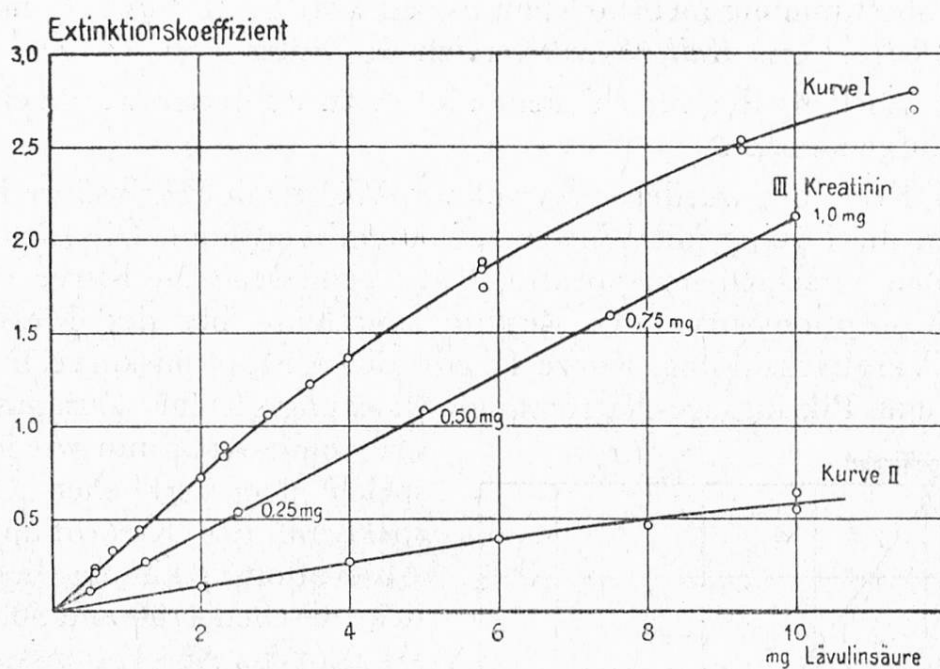


Fig. 2

Die Werte sind sehr genau reproduzierbar. Bei weiteren Messungen braucht daher die Eichkurve nicht mehr jedes Mal aufgestellt zu werden. Für die Berechnung gilt die Beziehung:

$$\text{mg Kreatinin in } 50 \text{ cm}^3 = 0,468 \cdot \frac{E}{s}$$

E = abgelesene Extinktion s = Schichtdicke in cm

Nach *Riffart* und *Keller* (loc. cit.), die unter ähnlichen Bedingungen arbeiteten, berechnet sich der Proportionalitätsfaktor zu 0,463.



**Tabelle 6**  
**Eichkurve für Kreatininbestimmung**

mg Kreatinin in 50 cm <sup>3</sup>	Schichtdicke s cm	Extinktion E (Mittel aus 5 Ablesungen)	Extinktionskoeff. k $k = \frac{E}{s}$	Faktor Extinktionskoeff. 1 = mg Kreatinin
0,050	2	0,222	0,111	0,451
0,125	2	0,534	0,267	0,468
0,250	2	1,075	0,5375	0,465
0,500	1	1,080	1,080	0,463
0,750	0,5	0,795	1,570	0,477
1,000	0,5	1,063	2,126	0,470
1,500	0,5	1,515	3,030	(0,495)

### II. Lävulinsäurebestimmung

Ich habe die Lävulinsäure nach der Methode von *Staub* aus der wässrigen Lösung des Untersuchungsmaterials quantitativ ausgeäthert und nach dem Verdampfen des Äthers kolorimetrisch bestimmt.

#### Verteilungskoeffizient

Zunächst wurde der Verteilungskoeffizient bestimmt, um abschätzen zu können, mit welcher Äthermenge und wie oft ausgeschüttelt werden muss, um die Lävulinsäure einigermaßen quantitativ zu extrahieren.

4 cm<sup>3</sup> 0,5%ige Lävulinsäurelösung (20 mg) wurden mit 4 cm<sup>3</sup> Äther geschüttelt. Nach erfolgter Trennung der Schichten wurden aliquote Teile der Lösungen eingedampft und die Lävulinsäure bestimmt.

Ich fand die Werte:

Wässrige Schicht (10 % Volumvermehrung infolge Lösung von Äther)

in 1 cm<sup>3</sup> = 3,83 mg; in 4,4 cm<sup>3</sup> = 16,84 mg

Ätherische Schicht:

in 1 cm<sup>3</sup> = 0,87 mg; in 3,6 cm<sup>3</sup> = 3,13 mg

Summe = 19,97 mg

Der Verteilungskoeffizient  $k = \frac{C_{\text{H}_2\text{O}}}{C_{\text{Äther}}}$  zwischen Wasser und Äther be-

rechnet sich zu 4,4, d. h. nach Einstellung des Gleichgewichts ist die Konzentration der Lävulinsäure in der wässrigen Phase 4,4 mal grösser als im Äther.

Die Tabelle 7 gibt die durch Rechnung gefundenen Lävulinsäuremengen wieder, die nach verschiedenartigem Ausäthern noch in der wässrigen Lösung bleiben.

Tabelle 7

## Ausschütteln der Lävulinsäure mit Äther

Nach n-maligem Ausschütteln mit je 5 cm<sup>3</sup> Äther verbleiben in der wässrigen Phase :

n	Volumen der wässrigen Phase		
	0,5 cm <sup>3</sup>	1,0 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>
	%	%	%
1	30,6	46,8	81,5
2	9,35	21,9	66,4
3	2,86	10,3	54,1
4	0,88	4,81	44,1
5	0,27	2,23	35,5
6	0,08	1,05	29,2

Da die Lävulinsäure in Wasser leichter löslich ist als in Äther, muss das Untersuchungsmaterial in möglichst wenig Wasser gelöst und mit verhältnismässig viel Äther ausgeschüttelt werden. Nach folgender Arbeitsweise habe ich gute und ziemlich genau reproduzierbare Resultate erhalten:

## Methodik

0,2 bis 0,3 g Substanz werden in ein geräumiges Reagensglas abgewogen und in 0,5 bis höchstens 1 cm<sup>3</sup> Wasser unter Erwärmen im Wasserbad gelöst. Nach dem Erkalten wird mit 1 Tropfen Schwefelsäure 1 : 1 angesäuert und 5 mal mit je 5 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt. Der Äther wird entweder durch Ausgiessen unter leichter Drehung des Reagensglases oder mittels einer Saugpipette entfernt. Die vereinigten Ätherauszüge werden nach Zusatz einer Messerspitze voll Natriumbicarbonat auf dem Wasserbad verdampft und der Rückstand mit 1,5 cm<sup>3</sup> Pikrinsäurelösung und 1 cm<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/oiger Natronlauge vermischt, 30 Minuten stehen gelassen, mit Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt und sofort kolorimetriert. Der Lävulinsäuregehalt wird in einer Eichkurve abgelesen.

## Eichkurve

Die Eichkurve wurde mit reiner, nach der Vorschrift von *Seissl*<sup>10)</sup> selbst dargestellter und im Vakuum destillierter Lävulinsäure aufgestellt.

Aliquote Teile einer wässrigen, 1 g Lävulinsäure in 100 cm<sup>3</sup> enthaltenden Lösung wurden nach Zusatz von etwas Natriumbicarbonat auf dem Wasserbad eingedampft und nach dem Erkalten mit 1,5 cm<sup>3</sup> gesättigter Pikrinsäurelösung und 1 cm<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/oiger NaOH vermischt. Nach 30, also nicht nach 5 Minuten wie bei der Kreatininbestimmung, wurde mit Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt und im Pulfrich Photometer sofort gegen eine gleichzeitig bereitete NaOH-Pikrinsäurelösung gleicher Konzentration unter Verwendung des Filters S 50 photometriert.

Die Reproduzierbarkeit der Werte ist nicht sehr gut.

Nach dem Vermischen des Abdampfrückstandes mit Natronlauge und Pikrinsäure kristallisiert meist schon nach kurzer Zeit Natrium-Pikrat in feinen, dicht miteinander verfilzten Nadelchen aus. Dadurch wird die Pikrinsäurekonzentration in der Lösung

stark vermindert, was auf die Intensität der Färbung einen Einfluss hat. Bei Versuchen, wo die Kristallisation etwas verzögert war, wurde im allgemeinen eine etwas intensivere Färbung erhalten als bei solchen, wo sie sofort einsetzte.

Die Eichkurve (Figur 2 Kurve I) verläuft bei niedrigen Gehalten bis etwa 3 mg Lävulinsäure linear, bei höheren Gehalten ist sie schwach gekrümmt.

### *Die Kreatinin vortäuschende Wirkung der Lävulinsäure*

Die Farbreaktionen der Lävulinsäure und des Kreatinins mit Pikrinsäure unterscheiden sich im Farbton nicht voneinander. Lävulinsäure gibt jedoch selbst unter Versuchsbedingungen, wo das Maximum der Färbung erreicht wird, eine viel weniger intensive Reaktion als Kreatinin. Unter den Bedingungen der Kreatininbestimmung, also bei nur 5 Minuten Reaktionszeit und in etwas verdünnterer Lösung, gibt die Lävulinsäure eine noch viel schwächere Färbung. In der Figur 2 ist die unter diesen Bedingungen erhaltene Eichkurve II für Lävulinsäure ebenfalls eingezeichnet. Sie dient zur Berechnung des von einer bestimmten Menge Lävulinsäure vorgetäuschten Kreatiningehalts. Aus den Kurven lässt sich ablesen, dass beispielsweise 4,0 mg Lävulinsäure die gleiche Färbung geben wie 0,127 mg Kreatinin. (In der Figur 2 sind die Lävulinsäure-Kurven I und II gegenüber der Kreatinin-Eichkurve III 10 mal überhöht eingezeichnet.)

Enthält ein Präparat 1 % Lävulinsäure, so täuscht diese also 0,032 % Kreatinin oder ca. 0,6 % Fleischextrakt vor. Nach Angaben von *Staub* sollen 1—2 % Lävulinsäure bis 6 % Kreatinin vortäuschen. Ein Wert von ähnlicher Grössenordnung ergibt sich allerdings, wenn man die maximale Färbung der Lävulinsäure-Reaktionsmischung mit der Kreatinin-Eichkurve vergleicht. Für das erste, lineare Stück der Kurve I findet man dann, dass 1 % Lävulinsäure 0,17 % Kreatinin oder ca. 3,4 % Fleischextrakt vortäuschen würde. Diese Berechnungsart ist aber unrichtig, weil die Lävulinsäure-Reaktion unter den Bedingungen der Kreatininbestimmung längst nicht ihr Maximum erreicht.

### *Kreatininbestimmung*

#### *Methodik*

Reagenzien: 1,2%ige wässrige Pikrinsäurelösung  
Salzsäure 1:1  
10%ige Natronlauge  
Aluminiumoxyd, am besten «Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> standardisiert zur Adsorptionsanalyse nach *Brockmann*». Es kann aber auch irgend ein anderes Aluminiumoxyd verwendet werden.

Je nach dem zu erwartenden Kreatiningehalt werden 2 bis 5 g Substanz in ca. 25 cm<sup>3</sup> heissem Wasser gelöst. Enthält das Präparat Fett, so wird die Lösung nach dem Erkalten durch ein Wattebäuschchen filtriert und das Filtrat im Messkolben auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt. 5 cm<sup>3</sup> dieser Lösung werden in einem Porzellanschälchen mit 10 cm<sup>3</sup> Salzsäure 1 : 1 versetzt und auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird nach dem Erkalten mit 15 cm<sup>3</sup> 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 schwachem Absaugen durchfiltriert und das stets hellgelbe oder fast farblose Filtrat in einem Gläschen aufgefangen.

5 cm<sup>3</sup> des klaren Filtrats werden in einem Porzellanschälchen mit 2 Tropfen Salzsäure angesäuert und auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingedampft. Die Flüssigkeit wird in ein grosses Reagensglas gegossen und das Schälchen mit wenigen Tropfen Wasser ausgespült. Die salzsaure Lösung, deren Volumen höchstens 1 cm<sup>3</sup> betragen soll, wird 4 mal mit je 5 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt, wobei das Reagensglas zur Sicherheit mit einem Gummistopfen verschlossen wird. Es ist aber darauf zu achten, dass womöglich nicht Flüssigkeit bis zum Gummistopfen verspritzt wird. Der Äther wird jeweils mittels einer Saugpipette\*) bis auf einen kleinen Rest abgesaugt. Die ausgeätherte Lösung wird quantitativ ins gleiche Porzellanschälchen zurück gebracht und auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft.

Der Trockenrückstand wird nun der Reihe nach mit 2 cm<sup>3</sup> Wasser, 1,5 cm<sup>3</sup> Pikrinsäure und 1 cm<sup>3</sup> Natronlauge versetzt, nach dem Umrühren genau 5 Minuten stehen gelassen und auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt. Die entstandene orangerote Färbung wird sofort im Pulfrichphotometer unter Benutzung des Filters S 50 und der geeigneten Küvette (meistens 1 cm Schichtdicke) gegen eine Natriumpikratlösung gleicher Konzentration photometriert. Da der Extinktionskoeffizient von 0 bis 1 mg der Kreatininmenge proportional ist, braucht die Eichkurve nicht aufgenommen zu werden.

Für die Berechnung gilt die Formel:

$$\begin{array}{l} \text{mg Kreatinin in 50 cm}^3 \text{ der Endlösung} \\ \text{(d. h. in } \frac{1}{30} \text{ der Einwaage)} \end{array} = 0,468 \cdot \frac{E}{s}$$

E = Extinktion    s = Schichtdicke in cm

Die Färbung kann auch im Duboscq-Kolorimeter oder in einem beliebigen andern Kolorimeter gemessen werden.

#### *Regenerierung des gebrauchten Aluminiumoxyds*

Das gebrauchte, meist ziemlich stark verunreinigte Aluminiumoxyd kann regeneriert werden.

Nachdem die Flüssigkeit durch die Schicht filtriert ist, wird diese zuerst mit ca. 5 cm<sup>3</sup> Alkohol und dann mit ca. 5 cm<sup>3</sup> Äther nachgewaschen. Nach kurzem Durchsaugen von Luft ist das Aluminiumoxyd trocken und lässt sich unter leichtem Klopfen gut aus dem Rohr herausschütten.

---

\*) Die Saugpipette stellt man sich aus einem Glasrohr von 8 mm äusserem Durchmesser her. Dieses wird einseitig zu einer langen Spitze mit ca. 0,5 mm lichter Weite ausgezogen. Die ganze Länge der Pipette beträgt 20—25 cm. Über das weite Ende wird eine Gummikappe gestülpt.



Das Aluminiumoxyd wird nun zunächst in einem geräumigen Becherglas mit Brunnenwasser und dann mit 2%iger Salpetersäure durch Dekantieren gewaschen, bis die überstehende Waschflüssigkeit nicht mehr gefärbt erscheint. Dann wird abgenutscht, das Aluminiumoxyd mit dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Das getrocknete, meist noch braun gefärbte Aluminiumoxyd wird nun in einer Platinschale geglüht. Zunächst, bei schwachem Erhitzen, entweicht viel Hydratwasser. Später, bei mässigem Glühen, entwickeln sich Stickoxyde, von adsorbierter Salpetersäure herrührend. Gleichzeitig werden alle organischen Verunreinigungen verbrannt. Nach kräftigem Glühen erscheint das Aluminiumoxyd vollständig weiss und ist nach dem Erkalten an der Luft wieder gebrauchsfertig.

### Zusammenfassung

1. Es werden 3 kolorimetrische Kreatininbestimmungsmethoden der Literatur an verschiedenen Bouillonpräparaten und Suppenwürzen des Handels ausprobiert und die Resultate miteinander verglichen.

2. Die Methode nach *Sudendorf* und *Lahrman*n, bei der störende Stoffe durch Permanganat oxydiert werden, gibt zu hohe und unzuverlässige Werte.

3. Die Methode *von Fellenberg*, bei welcher die störenden Stoffe an  $Al_2O_3$  adsorbiert werden, gibt niedrigere und gleichmässigere Werte. Bei Produkten mit beträchtlichem Lävulinsäuregehalt wird jedoch zu viel Kreatinin gefunden.

4. Nach der Methode *Staub*, bei der die Lävulinsäure durch Ausschütteln mit Äther entfernt wird, erhält man gut reproduzierbare Werte, die im allgemeinen mit denjenigen nach Methode *von Fellenberg* erhaltenen übereinstimmen. Bei fleischextraktfreien, vegetabilischen Würzen findet man auch nach dieser Methode beträchtliche scheinbare Kreatiningehalte.

5. Es wird eine neue Methode ausgearbeitet, bei welcher das Untersuchungsmaterial zunächst mit Salzsäure eingedampft wird. Der Trockenrückstand wird in Wasser aufgenommen und durch  $Al_2O_3$  filtriert. In einem aliquoten Teil des Filtrats wird anschliessend die Lävulinsäure durch Ausschütteln mit Äther entfernt und die *Folinsche* Reaktion ausgeführt. Nach dieser Methode werden die niedrigsten und sehr genau reproduzierbaren Kreatininwerte gefunden. Zu verschiedenen Produkten zugesetzte, genau bekannte Mengen Kreatinin wurden in allen Fällen nahezu quantitativ wieder gefunden.

6. Versuche, die unternommen wurden, um die Lävulinsäure durch Adsorption an Kalziumkarbonat oder an besonders vorbehandeltem Aluminiumoxyd zu entfernen, um auf diese Weise das umständlichere Ausäthern zu vermeiden, führten nicht zum Ziel.

7. Es werden einige Bemerkungen über kolorimetrische Messungen mit dem *Duboscq*-Kolorimeter und dem *Pulfrich*-Stufenphotometer gemacht. Ferner werden Eichkurven für Kreatinin- und Lävulinsäurebestimmungen gegeben.

## Résumé

1. On a appliqué trois méthodes colorimétriques de dosage de la créatinine indiquées dans la littérature, à diverses préparations pour bouillons et potages et on a comparé les résultats.

2. La méthode de *Sudendorf* et *Lahrmann*, dans laquelle les substances gênantes sont oxydées par le permanganate, donne des résultats trop élevés et incertains.

3. La méthode de *v. Fellenberg*, dans laquelle les substances gênantes sont adsorbées à l' $\text{Al}_2\text{O}_3$ , donne des résultats plus réguliers et plus faibles. Toutefois pour des produits riches en acide lévulique on obtient des valeurs de créatinine trop élevées.

4. La méthode de *Staub*, dans laquelle on élimine l'acide lévulique en agitant avec de l'éther, donne également des résultats régulièrement reproductibles, répondant en général à ceux obtenus par la méthode *v. Fellenberg*. Dans des extraits végétaux exempts d'extraits de viande, on obtient aussi d'après cette méthode des résultats laissant conclure à une teneur apparente de créatinine.

5. On a élaboré une nouvelle méthode, dont le principe est le suivant: Evaporation de la substance à examiner en présence d'acide chlorhydrique; reprise du résidu sec par l'eau et filtration au travers de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; extraction d'une partie aliquote du filtrat par l'éther, afin d'en éliminer l'acide lévulique et faire la réaction de *Folin*. D'après cette méthode on obtient les valeurs les plus faibles, très exactement reproductibles pour les teneurs en créatinine. Des quantités connues de créatinine ajoutées à divers produits ont dans tous les cas été retrouvées pour ainsi dire quantitativement.

6. Des essais entrepris pour adsorber l'acide lévulique à du carbonate de calcium ou de l'alumine spécialement préparée, afin d'éviter l'extraction par l'éther plus compliquée, n'ont pas abouti.

7. On fait part enfin de quelques remarques relatives aux mesures colorimétriques faites à l'aide du colorimètre de *Duboscq* et du photomètre de *Pulfrich* et l'on communique des courbes-étalon pour le dosage de la créatinine et de l'acide lévulique.

## Literatur

- 1) *Th. Sudendorf* und *O. Lahrmann*, Z.U.L. **29**, 1 (1915).
- 2) *Th. von Fellenberg*, diese Mitt. **30**, 220 (1939).
- 3) *E. Remy*, Z.U.L. **74**, 383 (1937).
- 4) *M. Staub*, diese Mitt. **35**, 47 (1944).
- 5) Schweizerisches Lebensmittelbuch 4. Auflage S. 100.
- 6) *M. Staub*, diese Mitt. **35**, 59 (1944).
- 7) *H. Mohler* und *E. Helberg*, Z.U.L. **68**, 254 (1934).
- 8) *Kassel*, J. Biol. Chem. **100**, 58 (1933).
- 9) *A. Riffart* und *H. Keller*, Z.U.L. **68**, 113 (1934).
- 10) *Seissl*, A. **249**, 275.