

XXIV.

Zur quantitativen Bestimmung der Eiweiss- und Extractivstoffe in der Kuh- und Frauenmilch.

Von Immanuel Munk in Berlin.

Verschiedentlich bei Stoffwechselversuchen ausgeführte und für den Zweck der Feststellung des N-Umsatzes und der N-Ausnutzung ausreichende Bauschbestimmungen des Eiweiss in der Milch nach dem sehr handlichen Verfahren von Kjeldahl liessen es wünschenswerth erscheinen, zu wissen, wie viel von dem so ermittelten Gesamtstickstoff auf Eiweisskörper und wie viel auf sog. N-haltige Extractivstoffe entfällt. Unter letzteren sind bisher von Hoppe-Seyler¹⁾ in der Kuhmilch, von Tolmatscheff²⁾ auch in der Menschenmilch Lecithin, von Schmidt-Mülheim³⁾ Hypoxanthin und, in Bestätigung älterer Angaben, kleine Mengen Harnstoff (bis zu 0,01 pCt.) nachgewiesen worden, endlich hat Th. Weyl⁴⁾ mittelst seiner empfindlichen Farbenreaction (Nitroprussidnatriumlösung und verdünnte Natronlauge) auch Spuren von Kreatinin, Musso⁵⁾ in der Kuhmilch Spuren von Schwefelcyansäure gefunden.

Zur Mittheilung meiner Beobachtungen und Bestimmungen, die ich im Physiologischen Laboratorium der Landwirtschaftlichen Hochschule ausgeführt habe, finde ich um so mehr Anlass, als selbst die neueste Auflage (1893) des bekannten analytischen Handbuches von Hoppe-Seyler⁶⁾ bezüglich der Eiweissbestimmung in der Milch manche nicht ganz genaue und dabei sehr umständliche Methoden empfiehlt, dagegen der sehr

¹⁾ Physiolog. Chem. S. 725.

²⁾ Hoppe-Seyler's Med. chem. Untersuch. 1867. S. 272.

³⁾ Pflüger's Arch. XXX. S. 384.

⁴⁾ Ber. d. d. chem. Ges. XI. S. 2175.

⁵⁾ Maly's Jahresbericht f. 1877. S. 168.

⁶⁾ Handb. der physiol. u. pathol.-chem. Analyse. 6. Aufl. Bearbeitet von F. Hoppe-Seyler u. H. Thierfelder. Berlin 1893. S. 462—465.

scharfen Gerbsäurefällung Sebelien's überhaupt nicht gedenkt, endlich die Ritthausen'sche Kupfermethode in der von ihrem Autor angegebenen Form beschreibt, in welcher nur bei sehr genauer Beachtung der einzuhaltenden Reaction des Gemisches die Eiweissfällung vollständig ist und die Bestimmung aus der Wägung des getrockneten Kupferniederschlags fehlerhaft, und zwar stets zu hoch, ausfällt (s. S. 514).

1. Alkoholmethode.

Am ehesten noch könnte man sich, das liegt wohl am nächsten, über die Menge des Eiweiss einerseits, der N-haltigen Extractivstoffe andererseits orientiren durch Fällung der Milch in der Kälte mit dem 4—5fachen Volumen starken Alkohols, in dem die oben aufgezählten Extractivstoffe löslich, die Eiweisskörper (bis auf geringe Antheile) unlöslich sind. Zweckmässig ist es nach Puls sowie Stenberg¹⁾ so viel Alkohol zuzusetzen, dass der Gehalt des Gemisches an Alkohol 70—80 pCt., nach Hoppe-Seyler nur 60 pCt. beträgt. Der Niederschlag wird auf gewogenem Filter gesammelt, mit Alkohol von 70 pCt. gewaschen, mit Aether vom Fett befreit, getrocknet, gewogen, dann verascht; der unverglühbare Rückstand wieder gewogen und von der vorher gefundenen Trockensubstanz in Abzug gebracht. Nun hat sich aber gezeigt, dass bei dem eben geschilderten Verfahren nicht alle Eiweissstoffe ausgefällt werden, selbst nicht, wenn man laut Hoppe-Seyler's Empfehlung vor dem Alkoholzusatz die Milch mit sehr verdünnter Essigsäure bis zur schwach sauren Reaction versetzt. Auch dann bleiben noch Spuren von Eiweissstoffen in Lösung, und zwar nach meinen später (S. 513) anzuführenden Controlbestimmungen $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{20}$, im Mittel $\frac{1}{30}$ vom Gesamteiw. Deshalb rät Hoppe-Seyler, die alkoholischen Filtrate einzudampfen, den Rückstand in Wasser zu lösen, mit Gerbsäure zu fällen und diesen Niederschlag zu der Alkoholfällung hinzuzugeben, Filter + Niederschlag mit einer gewogenen Menge Eisenoxyd zu veraschen, zu wägen und die feuerbeständigen Salze vom Gewicht der Eiweissstoffe in Abzug zu bringen. Einfacher ist es, die vielen umständlichen und zeitraubenden

¹⁾ Nord. med. Arkiv. IX. No. 7.

Wägungen der Niederschläge, sowie das langwierige Entfetten, Trocknen, Veraschen und Wiederwägen nach dem sehr empfehlenswerthen Vorschlage von Sebelien¹⁾ dadurch zu umgehen, dass man die gut ausgewaschenen Niederschläge nebst ungewogenem (schwedischem) Filter nach Kjeldahl verarbeitet, und aus dem gefundenen N-Gehalt²⁾ durch Multiplication mit 6,37 die Eiweissmenge zu berechnen, beträgt doch der N-Gehalt der Eiweisskörper in der Kuhmilch 15,7 pCt.³⁾ Die gesammten Filtrate werden dann auf ein kleines Volumen eingedampft und gleichfalls nach Kjeldahl behandelt; der nunmehr gefundene N entspricht dem N der nicht eiweissartigen, sog. Extractivstoffe.

2. Fällen des Caseïns durch sehr verdünnte Säuren und des Albumins durch Erhitzen.

Um einen festen Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen und Discussionen zu haben, erscheint es zweckmässig, zunächst die Frage zu beantworten, auf welchem Wege die Eiweisskörper der Milch vollständig ausgefällt werden. Die genauesten Ermittlungen in dieser Hinsicht verdanken wir Sebelien. Nachdem zuerst Almén (1871) die Anwendung von Gerbsäure für quantitative Eiweissbestimmungen in Vorschlag gebracht, weiterhin Liborius⁴⁾, Girgensohn⁵⁾ und Taraszkiewicz⁶⁾ versucht hatten, die Tanninfällung zu einer (volumetrischen und) gewichtsanalytischen Bestimmung der Eiweisskörper in der Milch auszugestalten, ein Versuch, der schon deshalb aufzugeben ist, weil die Gerbsäureniederschläge keinen constanten,

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie. XIII. S. 136.

²⁾ Vortheilhaft verwendet man zu allen Bestimmungen ein und dasselbe schwedische Filtrirpapier, z. B. das von Schleicher u. Schüll hergestellte No. 589, Durchmesser des (nicht zusammengelegten) Filters 12,5 cm, von dem man mehrere, z. B. 3 oder 6, mit Schwefelsäure nach Kjeldahl oxydirt und so den Durchschnitts-N-Gehalt ermittelt; derselbe beträgt nach meinen Bestimmungen für 1 Filter nur 0,54 mg N, kann also füglich vernachlässigt werden.

³⁾ $15,7 : 100 = 1 : 6,37$.

⁴⁾ Beiträge zur quant. Eiweissbestimmung. Diss. Dorpat 1871.

⁵⁾ Beitrag zur Albuminometrie und zur Kenntniss der Tanninverbindung der Albuminate. Diss. Dorpat 1872.

⁶⁾ Einige Methoden zur Werthbestimmung der Milch. Diss. Dorpat 1873.

sondern zwischen 57 und 64 pCt. schwankenden Eiweissgehalt besitzen¹⁾, hat Sebelien festgestellt, dass aus reinen Lösungen von Hühnereiweiss, von Casein und Calciumphosphat, Lactalbumin, wofern dieselben nur nicht salz- oder aschefrei sind, durch Gerbsäure in der Kälte jede Spur von Eiweisssubstanz gefällt wird, so dass die Filtrate sich als N-frei erweisen. Von der Richtigkeit dieser Angaben kann man sich leicht überzeugen. Demgemäss wird es das einfachste sein, jede der bisher vorgeschlagenen und gebräuchlichen Methoden zur Eiweissbestimmung in der Milch mittelst dieses Reagens zu prüfen. Nur die Methode darf als eine das Eiweiss vollständig fällende erachtet werden, bei der das Filtrat vom Eiweissniederschlag mit Gerbsäure keinen (oder wenigstens keinen N-haltigen) Niederschlag giebt. Als Gerbsäurelösung verwendet man zweckmässig die haltbare Almén'sche Mischung²⁾.

Prüft man nun mit diesem Reagens die verschiedenen, zur Eiweissfällung vorgeschlagenen Methoden nach, so zeigt sich, dass keine von ihnen genaue Werthe liefert, weder die bekannte, nach einem Vorschlag von Millon und Comaille weiter ausgebildete Hoppe-Seyler'sche Methode, bei der die Kuhmilch mit dem 19fachen Volumen Wasser verdünnt, dann durch sehr verdünnte Essigsäure und den CO₂-Strom das Casein, im Filtrat davon durch Erhitzen zum Sieden das Albumin gefällt wird, noch die Modification dieser Methode seitens Th. Weyl und J. Frenzel³⁾, wobei die Milch nur mit dem 4fachen Volumen Wasser versetzt und durch Schwefelsäure 1 pro mille (15 ccm auf 10 ccm Milch) das Casein niedergeschlagen wird, noch endlich die von E. Pfeiffer⁴⁾ empfohlene Fällung des Caseins durch 1procentige Salzsäure. Verfährt man genau nach den gegebenen

¹⁾ Sebelien, a. a. O. S. 147.

²⁾ 4 g Gerbsäure, 8 ccm 25procentige Essigsäure, 190 ccm 40—50procentigen Alkohol (also 90 ccm starker, 90procentiger Alkohol und 100 ccm Wasser).

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. IX. S. 247.

⁴⁾ Zeitschr. f. analyt. Chemie. XXII. S. 14; Analyse der Milch. Wiesbaden 1887. — Die Salzsäurefällung ist nicht zu empfehlen, einmal weil der geringste Säureüberschuss in viel stärkerem Grade Casein auflöst als Essigsäure, sodann weil man beim vorsichtigsten Operiren nicht selten ein milchiges Filtrat erhält.

Vorschriften, dass man die Kuhmilch entsprechend mit Wasser verdünnt, mit der sehr verdünnten Säure vorsichtig bis zur beginnenden flockigen Ausfällung versetzt, event. nach Hoppe-Seyler noch CO_2 durchleitet, nach 12—14stündigem Stehen den Caseinniederschlag abfiltrirt, auswäscht, Filtrate nebst Waschwässern auf freiem Feuer zum Sieden erhitzt, nach dem Erkalten das gefällte Albumin abscheidet, so sind die letzten Filtrate nicht eiweissfrei. Ausnahmslos geben sie nach vorgängigem Zusatz von etwas Salz (Kochsalz, Magnesiumsulfat)¹⁾ mit Gerbsäure einen Niederschlag, der am geringsten ist bei Hoppe-Seyler's Methode, hier aber noch $\frac{1}{17} - \frac{1}{15}$ vom Gesamteiweiss beträgt. Zweckmässig verfährt man hier, wie bei allen Bestimmungen, in der Weise, dass man die Tanninfällung abfiltrirt, auf dem Filter mit kaltem Wasser auswäscht, Filter nebst Niederschlag noch feucht nach Kjeldahl behandelt; der gefundene N-Gehalt, mit 6,37 multiplicirt, giebt die Menge des bei jenen Methoden der Fällung entgangenen und erst durch Gerbsäure niedergeschlagenen Eiweiss.

Belegbeispiele: Kuhmilch mit 0,56 pCt. N (nach Kjeldahl) und 0,526 pCt. Eiweiss-N (Gerbsäuremethode). 20 ccm Milch, nach Hoppe-Seyler mit Wasser auf 400 ccm verdünnt, mit verdünnter Essigsäure und CO_2 gefällt, Casein abfiltrirt, ausgewaschen; Filtrat und Waschwasser über freiem Feuer kochend auf die Hälfte eingedampft, nach dem Erkalten vom Albuminniederschlag abfiltrirt, ausgewaschen; das neuerliche Filtrat mit Gerbsäure gefällt. Der abfiltrirte und ausgewaschene Niederschlag giebt nach Kjeldahl 0,0072 g N = 0,036 pCt. N, entsprechend 6,8 pCt. vom Eiweiss-N.

Eine andere Milch mit 0,554 pCt. Ges.-N und 0,521 pCt. Eiweiss-N, ebenso behandelt, giebt nach Ausfällung des Casein und Albumin noch mit Gerbsäure einen Niederschlag, entsprechend 0,033 pCt. N, so dass 6,4 pCt. vom Eiweiss-N der Hoppe-Seyler'schen Methode entgangen sind.

Eine dritte Milchprobe mit 0,484 pCt. Ges.-N und 0,454 pCt. Eiweiss-N (Tanninfällung) giebt, nach Hoppe-Seyler behandelt, ein Filtrat, aus dem noch durch Gerbsäure niedergeschlagen wird: 0,0052 N = 0,026 pCt. N, entsprechend einem Rückstand von 5,7 pCt. des Eiweiss-N.

Man könnte denken, dass der bei diesem Verfahren der Fällung entgangene Antheil von Eiweiss nicht Casein bzw. Albumin, sondern das von Hammarsten²⁾ zuerst in der Milch

¹⁾ In salzfreien Lösungen kann die Ausfällung des Eiweiss durch Tannin unvollständig sein.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. VII. S. 250.

vermuthete, später (unter seiner Leitung) von Sebelien¹⁾ in geringer Menge nachgewiesene Lactoglobulin ist. Allein da nach des Letzteren Angabe das Globulin in salzhaltiger Lösung bei 72—74° coagulirt, ist nicht recht einzusehen, weshalb gerade dieses beim Erhitzen zum Sieden sich der Fällung entzogen haben sollte. Neuestens macht auch Hoppe-Seyler²⁾ die Angabe, dass der Albuminniederschlag auch „Spuren von Globulin coagulirt enthält“. Zum Ueberfluss habe ich zu dem bei der Hoppe-Seyler'schen Methode nach Abscheidung des Caseins erhaltenen Filtrate noch so viel Kochsalz hinzugesetzt, dass die Mischung 10 pCt. davon enthielt, eine Concentration, in der die Coagulation des Globulin bei 74° sicher eintritt, ohne dadurch die Ausfällung besser zu gestalten; immer erwies sich das Filtrat noch eiweisshaltig; Zusatz von Gerbsäure erzeugte einen feinflockigen Niederschlag.

Endlich könnte man noch auf die Vermuthung kommen, dass die durch Gerbsäure bewirkte Fällung auf das in der Milch von manchen Autoren angegebene Pepton zu beziehen sei. Allein, wie Hofmeister³⁾, Dogiel⁴⁾ und auch Sebelien⁵⁾ mit Bestimmtheit zeigen konnten, ist die frische Milch (Kuh-, Menschenmilch) frei von Pepton bezw. Albumosen; wo solche nachweisbar werden, sind sie durch das in Anwendung gekommene Versuchsverfahren zum Nachweis bezw. Abscheidung der anderen Eiweisskörper (Casein, Albumin, Globulin) z. B. Erhitzen mit Säuren oder Labgerinnung oder durch Zersetzung der Milch beim Stehen entstanden.

Während Hoppe-Seyler noch neuestens (1893) angiebt, dass seine Methode der Caseinbestimmung „für die menschliche Milch nicht anwendbar ist, weil das Casein dieser Milch mit Wasser, Essigsäure und CO₂ nur unvollkommen gefällt wird“, hat J. Schmidt⁶⁾ sich überzeugt, dass die Fällung auch bei der

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. IX. S. 446.

²⁾ a. a. O. S. 463.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. II. S. 288.

⁴⁾ Ebenda. IX. S. 591.

⁵⁾ Ebenda. XIII. S. 151.

⁶⁾ Materialien zur Erklärung der Eigenschaften der Frauen- und Kuhmilch. Diss. Moskau 1882.

Menschenmilch so vollständig als bei der Kuhmilch erfolgt, wofern beim Zusatz von Essigsäure und während des Einleitens von CO_2 die Milch auf 40° erhalten wird. Analog empfiehlt Pfeiffer auch seine Ausfällung des Caseïns aus der Frauenmilch mit verdünnter Salzsäure gleichfalls bei 40° vorzunehmen.

Hat es daher besonderes Interesse, nicht nur den Gesamteiweissgehalt der Milch zu kennen, sondern auch zu wissen, in welchem Verhältniss das Caseïn zum Albumin (und Globulin) steht, so wird man zu der Methode der Ausfällung mit verdünnter Essigsäure (und dem CO_2 -Strom) recurriren, sich aber dabei vergegenwärtigen müssen, dass man bei diesem zeitraubenden Verfahren rund $\frac{1}{16}$ des thatsächlichen Gehaltes zu wenig findet.

Anstatt des höchst umständlichen und langwierigen Verfahrens, den auf gewogenem Filter gesammelten Caseïn-Butterniederschlag erst mit Wasser, dann einmal mit kaltem Alkohol zu waschen, an der Luft zu trocknen, im Soxhlet'schen Extractionsapparat vom Butterfett zu befreien, Filter + Caseïnniederschlag bei 120° zu trocknen, zu wägen, im Tiegel unter Zusatz einer gewogenen Portion Eisenoxyd¹⁾ zu veraschen und das Gewicht der Asche von dem Caseïngewicht in Abzug zu bringen, wird man zweckmässig den mit Wasser gewaschenen Caseïnniederschlag sammt Filter in einen Kjeldahl-Kolben überführen, mit Schwefelsäure unter Zusatz von etwas Kupfersulfat oxydiren und aus dem gefundenen N-Werth durch Multiplication mit 6,37 das Caseïn berechnen. Ebenso würde man in dem, Albumin und Globulin (neben Resten von Caseïn) enthaltenden Filtrate die durch Erhitzen zum Sieden gewonnene, auf kleinem Filter gesammelte sog. Albuminfällung direct nach Kjeldahl behandeln. Immerhin wird man so durch 2 einfache Kjeldahl-Bestimmungen und ohne Benutzung gewogener Filter schärfere Resultate erhalten und schneller zum Ziel gelangen, ja selbst dann noch an Zeit erheblich sparen, wenn man daneben in einer zweiten Portion von 10 ccm oder g Milch nach Eintrocknen über Quarzsand durch Extraction in Soxhlet's Apparat mittelst Aethers das Butterfett bestimmt.

¹⁾ Dieser Zusatz geschieht, um die beim Veraschen des Caseïns aus dem Phosphor desselben frei werdende Phosphorsäure zu binden.

Schärfer als durch verdünnte Säuren und vollständig erfolgt die Ausfällung des Caseïns und auch des Globulins und dessen Trennung vom Albumin nach Hoppe-Seyler und dessen Schülern, Tolmatscheff und Makris¹⁾, durch Sättigen der Milch mit Magnesiumsulfat, ein Verfahren, das speciell für die Menschenmilch empfohlen worden ist, weil in dieser durch Säurezusatz, wenigstens in der Kälte (s. oben), das Caseïn nur ganz unvollkommen gefällt wird. Das Verfahren ist ausserordentlich langwierig, weil die Filtration des Caseïnniederschlags und das Auswaschen desselben mit concentrirter $MgSO_4$ -Lösung selbst unter Benutzung der Wasserstrahlpumpe nur sehr langsam vor sich geht. Hoppe-Seyler sieht von der Bestimmung des Caseïns in diesem Niederschlag ab und benutzt nur das caseïnfreie Filtrat zur Albuminbestimmung, indem er dasselbe unter Zusatz von etwas Essigsäure aufkocht, den Niederschlag auf gewogenem Filter sammelt, wäscht, trocknet u. s. w. Das Caseïn wird hierbei indirect aus der Differenz des durch eine besondere Bestimmung ermittelten Gesamteiweiss und des vorstehend gefundenen Albumins berechnet. Will man diese entschieden scharfe Methode der Caseïn- und Albumintrennung durch Sättigen mit $MgSO_4$ anwenden, so empfiehlt es sich auch hier, das (ungewogene) Filter nebst Caseïnniederschlag und anhaftendem $MgSO_4$ nach Kjeldahl zu behandeln und ebenso das Filter nebst Albuminfällung; man gewinnt so directe Werthe für das Caseïn (+ Globulin) und für das Albumin der Milch.

3. Tanninmethode.

Handelt es sich, wie in der überwiegenden Mehrzahl aller physiologischen und Nahrungsmitteluntersuchungen, nur darum, den Gesamtgehalt der Milch an Eiweiss, ohne Berücksichtigung der Vertheilung desselben auf die verschiedenen Eiweissstoffe, exact zu ermitteln, so geschieht dies ausserordentlich scharf, wie schon oben kurz berührt, durch die Fällung mit Gerbsäure. Man verfährt hierbei nach den von Sebelien für Kuhmilch angegebenen Vorschriften so, dass man 5 g²⁾ Milch mit einigen

¹⁾ Die Eiweisskörper der Kuh- und Menschenmilch. Diss. Strassburg 1876.

²⁾ Will man im Filtrat des Tanninniederschlags den Extractiv-N be-

(nach meinen Erfahrungen mindestens 9) Vol. Wasser verdünnt, etwas Kochsalzlösung zusetzt¹⁾ und in der Kälte mit Gerbsäurelösung (bezw. der Almén'schen Tanninmischung) im Ueberschuss ausfällt. Der Niederschlag wird mit kaltem Wasser gewaschen²⁾, Filter und Niederschlag nach Kjeldahl behandelt; der gefundene N-Werth, mit 6,37 multiplicirt, giebt die Gesammtmenge der Eiweissstoffe in der Milch. So scharfe Resultate diese Methode liefert, so ist sie doch mit einem Uebelstande behaftet, nemlich dass der Gerbsäureeiweissniederschlag, wenn er auch ursprünglich feinflockig ist, auf dem Filter eine die Wand bedeckende und die Poren z. Th. verstopfende zähe Masse bildet, daher das Auswaschen des Niederschlages bis zur Chlorfreiheit des Waschwassers nur sehr zögernd von Statten geht. Am besten verfährt man so, dass man den Niederschlag sich gut absetzen lässt, die darüber stehende klare gelbe, gut filtrirende Flüssigkeit zuerst aufgiesst und erst zuletzt den Niederschlag, im Flüssigkeitsrest durch Schütteln suspendirt, auf's Filter bringt und den Niederschlag mit dem Wasserstrahl der Spritzflasche von der Filterwand ablöst, um so das Auswaschen zu beschleunigen.

Sebelien hat diese Methode zwar zur Bestimmung der „Total-Eiweissmenge“ vorgeschlagen, sie aber dafür nicht verwandt, sondern nur das Filtrat von der Tanninfällung zur Bestimmung des „Reststickstoffs“ d. h. des in anderer Form, als in Eiweisskörpern enthaltenen sog. Extractiv-N verwendet, indem er die Filtrate nach Kjeldahl behandelte, und hat dabei, in Uebereinstimmung mit Schmidt-Mülheim, der noch nach der früher üblichen Weise mit Natronkalk verbrannt hat, gefunden, dass Kuhmilch in 100 ccm bezw. g 40—50 mg Extractiv-N enthält. Nur im Colostrum findet sich bis zu 80 mg N.

Ich habe nun die Tanninfällung und Behandlung des Gerbsäureniederschlages nach Kjeldahl für eine grössere Reihe von

stimmen, so sind mindestens 10 g Milch zu nehmen, weil sonst die absolute Menge des Extractiv-N zu gering wird.

- 1) Eine Lösung, die gar keine oder nur geringe Spuren von Mineralstoffen enthält, wird durch Gerbsäure nur schwer und nicht vollständig gefällt,
- 2) Beim Auswaschen mit heissem Wasser oder mit Alkohol geht, wie Sebelien richtig angegeben hat, ein messbarer Theil des gefällten Eiweiss wieder in Lösung.

Bestimmungen des Eiweiss in der Kuhmilch benutzt, gleichzeitig im Filtrat den Extractiv-N nach Kjeldahl bestimmt und endlich den Gesamt-N (Eiweiss- und Extractiv-N) der Milch direct nach Kjeldahl ermittelt. Letzteres geschah gewissermaassen zur Controle auf die Exactheit des Arbeitens bei der gesonderten Bestimmung des Eiweiss- und Extractiv-N. Das Auswaschen des Tanninniederschlages muss so lange geschehen, bis das Waschwasser keine Chlorreaction mehr giebt; vortheilhaft setzt man zur Milchprobe etwa 1 ccm conc. NaCl-Lösung hinzu.

Zur Bestimmung des Eiweiss- und Extractiv-N kamen je 10 ccm bezw. g Milch zur Anwendung, weil bei Verwendung von nur 5 ccm der N-Gehalt des eiweissfreien Filtrats zu klein wird; zur Bestimmung des Gesamt-N zumeist nur 5 ccm. Die untersuchte Kuhmilch war stets am Tage der Untersuchung des Morgens möglichst frisch geliefert; ein Theil der Proben entstammte der verkäuflichen Mischmilch der Bolle'schen Molkerei; der andere war aus Milchhandlungen entnommen.

In 100 Th. Milch	Gesamt-N	Eiweiss-N	Extractiv-N
I.	0,4754	0,442	0,023
II.	0,558	0,522	0,028
III.	0,532	—	0,031
IV.	0,483	0,457	0,034
V.	0,403	0,351	0,029
VI.	0,589	0,571	0,032
VII.	0,519	0,480	0,022
VIII.	0,481	0,453	0,031
IX.	0,416	0,391	0,025
X. ¹⁾	0,394	0,362	0,030
XI. ¹⁾	0,371	0,344	0,032.

Demnach beträgt im Mittel aller Bestimmungen

Eiweiss-N . . . 93,8 pCt. vom Gesamt-N

Extractiv-N . . . 6,2 - - -

und zwar ist im Maximum (XI) Extractiv-N . . . 8,6 pCt.

Minimum (I) Extractiv-N . . . 4,8 -

Zugleich ergibt die Summe von Eiweiss- und Extractiv-N nur geringe Differenzen gegenüber dem Gesamt-N, und zwar bald ein kleines Plus, bald ein geringes Minus.

¹⁾ Hier handelt es sich offenbar um gewässerte Milch.

Man wird demnach in den meisten Fällen ohne grossen Fehler aus dem Gesamt-N der Kuhmilch den Gehalt des darin eingeschlossenen Eiweiss-N berechnen können, wenn man den für 100 Theile Milch ermittelten Gesamt-N mit 0,94 multiplicirt. Der so berechnete Eiweiss-N-Werth giebt, mit 6,37 multiplicirt, den Procentgehalt an Eiweiss in der Milch.

Da Eiweissbestimmungen mittelst der so scharfen Tanninfällung an der Frauenmilch bisher nicht vorliegen, habe ich auch an dieser mehrere Analysen ausgeführt. Die menschliche Milch verdanke ich der Freundlichkeit des Herrn Dr. B. Bendix, der dieselbe durch Anlegen der Milchpumpe an die Brust einer Säugenden an verschiedenen Tagen entleert und mir möglichst frisch zur Untersuchung zugestellt hat. Bei dem niedrigen Eiweissgehalt der Frauenmilch braucht die Verdünnung mit Wasser nur das 4—5fache zu betragen, dagegen ist der Zusatz von etwas Kochsalz um so nothwendiger, als der Salzgehalt der Frauenmilch bekanntlich nur sehr gering ist (0,3 pCt.).

In 100 Th. Frauenmilch	I.	II.	III.	IV.	V. ¹⁾
Gesamt-N	0,206	0,224	0,242	0,201	0,206
Eiweiss-N	0,190	0,203	0,216	0,184	0,189
bleiben für					
Extractiv-N	0,016	0,021	0,026	0,017	0,017.

Somit beträgt der Extractiv-N der Frauenmilch nur 0,016 bis 0,026, im Mittel 0,02 pCt., also, absolut genommen, nur $\frac{2}{3}$ von dem der Kuhmilch, dabei aber einen relativ grösseren Bruchtheil vom Gesamt-N als in der Kuhmilch, indem der Eiweissgehalt der Frauenmilch, wie bekannt und wie auch durch vorstehende Bestimmungen bestätigt wird, nur niedrig ist. Es kommen nemlich, den Gesamt-N = 100 gesetzt, in der Frauenmilch

91 pCt. auf Eiweiss-N,

9 - - Extractiv-N.

Demnach wird man ohne wesentlichen Fehler aus dem den durch eine einfache Kjeldahl-Bestimmung ermittelten Gesamt-N der menschlichen Milch durch Multiplication mit 0,91 den Gehalt an Eiweiss-N berechnen dürfen.

¹⁾ Weitere Bestimmungen des Eiweiss-N durch die Kupferfällung und Controlbestimmungen dieser mit der Tanninfällung folgen auf S. 517.

Um nun aus der N-Bestimmung der Tanninfällung auf den Eiweissgehalt der Frauenmilch schliessen zu können, bedarf es, wie Hammarsten¹⁾ richtig bemerkt, der Kenntniss vom N-Gehalt der aus dieser Milch ausfällbaren Eiweisskörper. Da bisher keine darauf zielende Bestimmung vorliegt, habe ich eine solche ausgeführt, und zwar, da es hier darauf ankommt, das Eiweiss rein und nicht in Verbindung mit anderen Substanzen (z. B. Tannin oder Kupfersalz) zu haben, nach der Methode der Alkoholfällung. Es wurden gegen 80 ccm Frauenmilch gesammelt, allmählich unter Umrühren mit 300 ccm 90procentigen Alkohols versetzt, nach längerem Stehen abfiltrirt und unter möglichstem Abspritzen des Niederschlages von der Filterwandung zuerst mit kaltem 70procentigen, dann mit ebenso starkem heissen Alkohol ausgewaschen, zuletzt mit absolutem Alkohol und Aether. Nach dem Trocknen an der Luft wurde der Niederschlag nebst Filter, dessen freie Ränder umgekrempelt wurden, im Soxhlet'schen Apparat 24 Stunden lang mit Aether extrahirt und die fettfreie Trockensubstanz²⁾ fein gepulvert. 0,1036 g dieses Pulvers, mit 0,094 g Eisenoxyd im Platintiegel verbrannt, gaben 7,4 mg Asche, also enthielt das Pulver 7,14 pCt. Asche. 0,2544 g Pulver = 0,2361 g aschefrei gaben nach Kjeldahl 0,0372 N, folglich enthielt das aschefreie Eiweiss (Casein, Albumin, Globulin) der Frauenmilch 15,76 pCt. N, gegenüber 15,7 pCt. N der Eiweissfällung aus der Kuhmilch nach Sebelien. Um daher aus dem Eiweiss-N der Frauenmilch den Eiweissgehalt zu finden, ist der Werth für Eiweiss-N mit 6,34³⁾ zu multipliciren. Demnach beträgt der Gehalt der obigen 5 analysirten Proben von Frauenmilch (0,188 bis 0,216 pCt. N =) 1,19 bis 1,37 pCt. Eiweiss.

Endlich wurde noch die Tanninfällung in der Kuhmilch als Controle für die Eiweissbestimmung nach der Alkoholmethode (S. 502) ausgeführt, um so zu ermitteln, wie gross der Antheil von Eiweiss ist, der sich bei der Alkoholfällung der Bestimmung

¹⁾ Lehrbuch d. physiol. Chem. Wiesbaden 1891. S. 258.

²⁾ Um eine Verunreinigung mit Papierfasern möglichst zu verhüten, wurde das getrocknete Filter umgestürzt und, was dabei auf untergelegtes Glanzpapier fiel, zur weiteren Bearbeitung benutzt.

³⁾ 15,76 : 100 = 1 : 6,34.

entzieht. Auch in dem Alkoholniederschlag wurde das Eiweiss nach Kjeldahl bestimmt, jedesmal wurden 10 ccm Milch verwendet.

In 100 Th. Kuhmilch	I.	II.	III.	IV.
Tannin-N	0,503	0,455	0,529	0,5084
Alkohol-N	0,491	0,432	0,518	0,493.

Somit entzieht sich bei der Alkoholfällung ein kleiner Bruchtheil von Eiweiss, der in III 2 pCt., in I 2,4 pCt., in IV 3 pCt. und in II sogar 5 pCt. oder im Mittel 3,1 pCt. oder etwa $\frac{1}{30}$ vom Gesamteiweiss beträgt. Die Fehlerquelle bei der Alkoholfällung nebst N-Bestimmung des Niederschlages ist demnach so gering, dass sie, wenn es nicht gerade auf besonders scharfe Bestimmungen ankommt, fast vernachlässigt werden kann, zumal sie viel schneller zu Ende geführt werden kann; als die Tanninfällung, indem das Filtriren und Auswaschen mit 70procentigem Alkohol viel schneller, etwa in der halben Zeit vor sich geht, als bei der Gerbsäuremethode. Das Filtrat der Alkoholfällung¹⁾ giebt nach Verjagen des Alkohols und Behandeln nach Kjeldahl den Gehalt an Extractiv-N, der etwas zu hoch ausfallen muss, weil die Alkoholfällung eben um $\frac{1}{30}$ zu niedrige Werthe für den Eiweiss-N liefert.

Endlich sei noch erwähnt, dass das Filtrat vom Tanninniederschlag wiederholt mit Phosphorwolframsäure und Salzsäure versetzt worden ist, bekanntlich einem der feinsten Eiweissreagentien, um zu sehen, ob noch Spuren von Eiweiss sich der Fällung entzogen haben; niemals trat indess nur die geringste Trübung ein. Da jedoch im Verhältniss zur verwendeten Milch (10 ccm) das Filtrat sehr reichlich war — es betrug einschliesslich der Waschwässer das 25—40fache der Milchprobe — und Spuren von Eiweiss in solch' ausserordentlich starker Verdünnung möglicher Weise nicht oder kaum nachweisbar sein könnten, wurde einige Male das Filtrat so weit eingeeengt, dass sein Volumen nur das 3—5fache der Milch betrug; allein auch in dieser stärkeren Concentration erfolgte niemals mit Phosphorwolframsäure ein Niederschlag, so dass auf Grund dieser Erfahrung

¹⁾ Da der Alkohol zuweilen N-haltige Stoffe enthält, soll man in einem blinden Versuch den in der zugefügten Alkoholmenge präformirt vorfindlichen N nach Kjeldahl ermitteln.

gen die Vollständigkeit der Eiweissfällung durch Tannin eine weitere Stütze gewinnt.

4. Kupfermethode.

Ritthausen¹⁾ hat empfohlen, die gesammten Eiweissstoffe, wie folgt, auszufällen:

10 cem Milch werden mit Wasser auf 200 cem verdünnt, mit 5 cem Kupferlösung (103,9 g krystallisirter Kupfervitriol in Wasser zu 1 Liter aufgelöst) versetzt, dann verdünnte Natronlauge vorsichtig hinzugetropft, bis das Gemisch neutrale, aber eher noch ein wenig saure, als alkalische Reaction zeigt. Bei richtig getroffener neutraler Reaction setzt sich der Eiweisskupferniederschlag gut ab und das Filtrat enthält kein gelöstes Kupfer mehr. Nach Absitzen wird zuerst die klare Flüssigkeit durch gewogenes Filter abfiltrirt, der Niederschlag durch Aufrühren in Wasser und Decantiren gewaschen, aufs Filter gebracht, nachgewaschen, getrocknet, in Soxhlet's Extractor mittelst Aethers erschöpft, mit absolutem Alkohol nachgewaschen, Filter nebst Niederschlag bei 125° getrocknet, gewogen, verascht, der Glührückstand gewogen und von dem Gewicht des Niederschlages in Abzug gebracht.

Ritthausen hat sich überzeugt, dass die Filtrate der Kupferfällungen aus Kuhmilch im Mittel nur noch 0,02 pCt. N enthalten, also knapp so viel als dem Extractiv-N, wie oben gezeigt, entspricht; die Eiweissfällung war somit als vollständig zu betrachten.

Stenberg²⁾ hat bemerkt, dass diese Methode mit dem Fehler behaftet ist, dass das Kupferoxydhydrat, welches zusammen mit den Eiweisskörpern ausfällt, durch Trocknen bei 125° nicht alles Hydratwasser abgiebt, sondern erst beim Glühen; in Folge dessen fallen die Zahlenwerthe für das Totaleiweiss um das noch bei 125° zurückbleibende Hydratwasser zu hoch aus. Seltsamer Weise nehmen von den bekannteren analytischen Handbüchern weder das von Hoppe-Seyler³⁾, noch das von Schwanert⁴⁾ von diesem berechtigten Einwurf Stenberg's Notiz. Bei Röhmman⁵⁾ findet sich allerdings die Vorschrift, den Kupfereiweissniederschlag nur bei 100° zu trocknen, weil

¹⁾ Journ. f. prakt. Ch. [2.] XV. S. 329.

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O. S. 464.

⁴⁾ Analytisches Hilfsbuch. Braunschweig 1891. 3. Aufl. S. 232.

⁵⁾ Anleitung zum chemischen Arbeiten. Berlin 1890. S. 77.

bei dieser Temperatur derselbe kein Hydratwasser verliert. Allein ob man bei 100° ein Eiweisscoagulum von dem (ausser dem Hydratwasser) anhaftenden Wasser ganz befreien kann, wäre erst zu beweisen. Sebelien¹⁾ hat schon empfohlen, diese Fehlerquelle und zugleich die Aetherextraction dadurch zu umgehen, dass man den feuchten Kupfereiweissniederschlag direct nach Kjeldahl behandelt und aus dem so ermittelten N-Gehalt die Eiweissmenge berechnet. Allein auch in dieser wesentlich vereinfachten Form der Kupfermethode, bei der man auch eines gewogenen Filters nicht bedarf, ist es schwierig, den genau erforderlichen Alkalizusatz zu treffen. Der geringste Alkaliüberschuss löst schon etwas Caseinkupfer auf. Man hat nun verschiedene Proben angegeben, um sich von der völligen Ausfällung des Eiweiss und dem eben genügenden Alkalizusatz zu überzeugen, und wenn es auch bei Einhaltung aller Vorsichtsmaassregeln in den meisten Fällen gelingen wird, den richtigen Alkalizusatz zu treffen, so ist es doch wünschenswerth, diese Schwierigkeit wo möglich ganz aus dem Wege zu räumen und damit die Kupfermethode, bei der, wie alsbald durch Controlbestimmungen erhärtet werden wird, die Eiweissfällung eine vollständige ist, einfacher und sicherer umzugestalten.

Von diesem Wunsche geleitet, habe ich das von Stutzer²⁾ eingeführte haltbare Kupferoxydhydrat auf seine Brauchbarkeit geprüft, das auf den Landwirthschaftlichen Versuchsstationen im umfangreichen Maasse zur Bestimmung des Eiweiss in pflanzlichen Stoffen benutzt wird.

Stutzer's Vorschrift lautet: 100 g krystallisirter Kupfervitriol werden in 5 Liter Wasser gelöst und mit 2,5 g Glycerin versetzt. Aus dieser Lösung wird durch Zusatz verdünnter Natronlauge, bis die Flüssigkeit alkalisch reagirt, das Kupfer als Kupferoxydhydrat ausgefällt; letzteres wird abfiltrirt, alsdann durch Anreiben mit Wasser, welches im Liter 5 g Glycerin enthält, aufgeschlemmt. Durch wiederholtes Decantiren und Filtriren entfernt man die letzten Spuren von Alkali. Der Filterrückstand wird mit Wasser, das 10 pCt. Glycerin enthält, verrieben und zu einer solchen Verdünnung gebracht, dass derselbe eine gleichmässige, mit der Pipette aufsaugbare Masse bildet. Diese wird in gut verschlossener Flasche und im Dunkeln³⁾ aufbe-

¹⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chem. XIII. S. 138.

²⁾ Journ. f. Landwirthschaft. 1881. S. 473.

³⁾ oder in blauer bezw. brauner Flasche.

wahrt. Den Gehalt der breiigen Masse bestimmt man durch Eindunsten eines abgemessenen Volumens und Glühen des Rückstandes.

Enthalten die untersuchten Substanzen, wie pflanzliche und thierische Stoffe, phosphorsaure Alkalien und Erden, so kann sich auf Zusatz von Kupferoxydhydrat in der Wärme letzteres so umsetzen, dass unlösliches Kupferphosphat und freies (Eiweissstoffe lösendes) Alkali entsteht. Zur Verhütung dessen werden der mit Wasser erhitzten Substanz, vor dem Zusatz des Kupferoxydhydrates, 1 bis wenige ccm Alaunlösung hinzugefügt, wodurch das in Lösung befindliche Alkaliphosphat unter Bildung unlöslichen Alaunphosphates zersetzt wird, welches letzteres mit dem Kupferoxydhydrat weiter keine Umsetzungen eingeht.

Demnach gestaltet sich die von mir sowohl für Menschen- als Kuhmilch erprobte Modification der Ritthausen'schen Methode zur Fällung der gesammten Eiweissstoffe der Milch mittelst Kupferoxydhydrates, wie folgt:

10 ccm Frauen- oder Kuhmilch werden in einem 250 ccm fassenden Becherglase mit Wasser auf 100 ccm verdünnt (bei Frauenmilch genügt schon Verdünnung auf 60 ccm), erhitzt, zuerst 1—2 ccm Alaunlösung, dann, wenn die Flüssigkeit eben in's Sieden geräth, 2 bzw. 5 ccm von dem aufgeschwemmten Kupferoxydhydratbrei hinzugefügt und einige Minuten im Sieden erhalten. Der zumeist feinflockige Niederschlag, welcher sich, sobald die Mischung vom Feuer genommen wird, schnell absetzt, wird noch warm abfiltrirt, auf dem Filter mit heissem Wasser ausgewaschen und sammt Filter noch feucht nach Kjeldahl verbrannt.

Gewöhnlich ist die Kuhmilch so schwach alkalisch oder gar amphoter, dass in 10facher Verdünnung alkalische Reaction kaum noch nachzuweisen ist und in Folge dessen auch die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit farblos erscheint. Ist ausnahmsweise die alkalische Reaction der Milch etwas stärker, so ist sie vor dem Erhitzen und Kupferzusatz möglichst zu neutralisiren.

Das Verfahren ist ohne Unterschied gleichmässig bei Frauen- wie Kuhmilch anwendbar. Ich gebe zunächst die nach dieser Methode gewonnenen Resultate, zugleich mit Controlbestimmungen mittelst der Tanninfällung, von der im Vorstehenden erwiesen ist, dass sie die Eiweissstoffe vollständig einschliesst.

In 100 Theilen Frauenmilch¹⁾

	I.	II.	III.	IV.	V.
Tannin-N	0,190	0,203	0,216	0,184	0,190
Cu-N	0,192	0,210	0,211	0,181	0,186.

Somit fallen die N-Werthe der Kupferfällung fast mit denen der Tanninfällung zusammen; die Abweichungen beider treffen erst die 3. Decimale.

Ausserdem wurden noch einzelne Bestimmungen nur nach der Kupfermethode ausgeführt und zugleich der Gesamt-N ermittelt.

In 100 Theilen Frauenmilch²⁾:

	VI.	VII.	VIII.
Gesamt-N	0,264	0,238	0,229
Cu-N	0,239	0,218	0,211
bleibt für Extractiv-N	0,025	0,020	0,018.

Auch nach der Cu-Methode enthalten 100 ccm Frauenmilch 0,018—0,025 g Extractiv-N, und vom Gesamt-N entfallen auf

Eiweiss-N (90,5—92,2) 91,3 pCt.,

Extractiv-N (7,8—9,5) 8,7 -

das sind fast dieselben Werthe, welche bei der Tanninmethode im Filtrat gefunden worden sind (S. 511).

Ferner wurde ermittelt in 100 ccm Kuhmilch

	a	b	c	d	e
Gesamt-N	0,5994	0,628	0,549	0,585	0,561
Tannin-N	0,574	0,596	0,514	—	0,527
Kupfer-N	0,580	0,591	0,518	0,541	0,519.

Also liegen auch hier die Differenzen zwischen der Tannin- und der Kupfermethode erst in der 3. Decimale.

Da somit in der Frauenmilch wie in der Kuhmilch die Fällung der Eiweissstoffe mit Kupferoxydhydrat in der oben beschriebenen Modification fast dieselben Eiweiss-N-Werthe liefert wie die ausserordentlich scharfe Tanninfällung, ist der Kupfer-

¹⁾ Es sind dies dieselben, die oben (S. 511) bei der Bestimmung des Gesamt-N, Eiweiss- und Extractiv-N als I, II, III, IV, V bezeichnet worden sind.

²⁾ Diese Proben entstammen einer späteren Lactationsperiode, in der, wahrscheinlich bei geringerem Milchertrag, der Eiweissgehalt höher wurde.

methode für die praktische Ausführung der Vorzug zu geben, weil in Folge der Möglichkeit, den Niederschlag heiss zu filtriren und mit heissem Wasser auszuwaschen, die Bestimmung sich sehr viel schneller zu Ende führen lässt, als bei der Tanninmethode, welche, da das Filtriren in der Kälte erfolgt und auch der Niederschlag mit kaltem Wasser ausgewaschen werden muss (S. 509), die doppelte bis dreifache Zeit bis zur Ueberführung des Niederschlages nebst Filter in den Kjeldahl-Kolben erfordert.

Auf Grund vorstehender Erfahrungen komme ich somit zu folgenden Ergebnissen:

1. Aus den Eiweissfällungen der Kuh- und Frauenmilch lässt sich am schnellsten und schärfsten der Eiweissgehalt durch Bestimmung des von diesen Niederschlägen eingeschlossenen N nach Kjeldahl ermitteln. Beim Oxydiren von Niederschlag nebst (schwedischem) Filter kann der N-Gehalt des letzteren ($\frac{1}{2}$ mg N) berücksichtigt, er kann aber auch als minimal vernachlässigt werden.

2. Sowohl bei der Alkoholfällung zur Bestimmung der gesamten Eiweissstoffe als bei der Methode von Hoppe-Seyler zur gesonderten Ermittlung des Casein- und Albumingehaltes der Milch bleiben selbst bei sorgsamster Ausführung $\frac{1}{30}$ bzw. $\frac{1}{17}$ bis $\frac{1}{15}$ der Eiweissstoffe der Kuhmilch in Lösung.

3. Nur die Fällung mittelst Tannins in der Kälte nach Sebelien, sowie die von mir modificirte Fällung mittelst (aufgeschlemmten) Kupferoxydhydrates in der Siedhitze schlägt sowohl in der Kuhmilch als in der Frauenmilch alle Eiweissstoffe nieder. Dabei hat die Kupfermethode vor dem Tanninverfahren den Vorzug der sehr viel schnelleren Ausführbarkeit.

4. An Extractiv-N enthalten 100 Theile frische Kuhmilch 22—34 mg, 100 Theile Frauenmilch nur 14—26 mg N. Dabei entfallen von dem Gesamt-N der Kuhmilch reichlich $\frac{1}{5}$ auf Eiweiss-N und nur knapp $\frac{1}{8}$ auf Extractiv-N, von dem Gesamt-N der Frauenmilch $\frac{1}{4}$ auf Eiweiss-N und $\frac{1}{11}$ auf Extractiv-N.

5. Aus dem nach Kjeldahl festgestellten Werthe für den Gesamt-N der frischen Milch lässt sich mit für die meisten Fälle ausreichender Genauigkeit der Eiweiss-N berechnen, indem

man den Gesamt-N der Kuhmilch mit 0,94, den der Frauenmilch mit 0,91 multiplicirt.

6. Die aus der Menschenmilch gefällten Eiweissstoffe (Casein + Albumin + Globulin) enthalten, aschefrei berechnet, 15,76 pCt. N, daher sich durch Multiplication des für den Eiweiss-N gefundenen Werthes mit 6,34² sich der Eiweissgehalt ergibt. Der entsprechende Factor für Kuhmilch ist nach Sebelien 6,37.

XXV.

Der Einfluss des Chloroforms auf die künstliche Pepsinverdauung.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

Von Dr. Dubs aus Chicago.

Vor einigen Jahren theilte E. Salkowski¹⁾ eine Anzahl von Beobachtungen mit, welche darthun, dass das Chloroform in wässriger Lösung alle durch die Lebensthätigkeit von Mikroorganismen bedingten Fermentationsvorgänge verhindere, die Wirkung der Enzyme dagegen nicht störe, dass man somit in dem Chloroform ein vortreffliches Mittel besitze, um die Wirkung des lebenden Protoplasma (geformter Fermente) von der Wirkung gelöster Fermente (Enzyme) zu unterscheiden, ferner um Flüssigkeiten, welche leicht der Wirkung von Fäulnissbakterien unterliegen zu conserviren und um kleine Quantitäten von löslichen Fermenten in Flüssigkeiten und Organen des Körpers aufzusuchen. Diese Beobachtungen haben vielfache Bestätigung und Anwendung gefunden, so benutzt man allgemein das Chloroform zur Conservirung des Harns und vielfach auch in der Bakteriologie, wo es sich darum handelt Culturen von pathogenen Bakterien auf ihre Giftigkeit zu prüfen, ohne dass die Bakterien selbst dabei

¹⁾ Deutsche med. Wochenschrift. 1888. No. 16.