

Über Methoden zur Begutachtung des Fleischextraktes.

I. Mitteilung.

Von

Fr. Kutscher und **H. Steudel.**

Mitgeteilt von Fr. Kutscher.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. April 1903.)

Im Laufe ausgedehnter Untersuchungen über die Extraktivstoffe verschiedener Organe waren wir gezwungen, auch die Extraktivstoffe der quergestreiften Muskeln in den Kreis unserer Arbeit zu ziehen. Durchaus notwendig war es für uns, daß wir über reichliche Mengen Fleischextrakt verfügen und sicher sein konnten, der verwandte Fleischextrakt sei aus tadellosem Muskelfleisch dargestellt. Unseren Wünschen schien Liebigs Fleischextrakt, der in beliebiger Menge im Handel zu haben ist, völlig zu entsprechen. Der von Liebigs Kompagnie in den Handel gebrachte Fleischextrakt steht unter ständiger Kontrolle zweier namhafter Gelehrter, der Professoren Voit und Rubner, die mit ihrem Namen für die Güte des vertriebenen Fleischextraktes garantieren; und wir können wohl als sicher annehmen, daß Voit und Rubner den Fleischextrakt von Liebigs Kompagnie nach bestimmten Methoden untersuchen, die ihrer Meinung nach imstande sind, die Güte des Fleischextraktes festzustellen. Diese Methoden sind aber nicht publiziert. Den gänzlichen Mangel an bekannten Methoden, die schnell und leicht gestatten, den Fleischextrakt des Handels zu prüfen, empfanden wir sehr störend, als wir uns selbst noch von der Güte der gekauften Proben überzeugen wollten. Wir waren daher gezwungen, erst nach Methoden zu suchen.

die uns geeignet erschienen, uns die völlige Tadellosigkeit des im Handel erhältlichen Fleischextraktes zu versichern. Dabei kamen wir aber zu Resultaten, die uns überraschten und uns zwangen, vor der Hand von der wissenschaftlichen Verwendung von Liebigs Fleischextrakt Abstand zu nehmen.

Wir gingen von der theoretischen Überlegung aus, daß der Gehalt eines gegebenen Fleischextraktes an Bernsteinsäure ein Maß für die Güte des Ausgangsmaterials, aus dem er gewonnen war, abgeben mußte.

Wir stützten uns bei den Erwägungen, die uns zu dem obengenannten Schluß führten, auf die Arbeiten von E. Salkowski, Blumenthal und Magnus-Levy. Nach den Arbeiten von E. Salkowski¹⁾ fehlt im schnell verarbeiteten Muskelfleisch des eben getöteten Tieres die Bernsteinsäure und bildet sich auch bei der Autodigestion des Fleisches in Chloroformwasser nicht, dagegen erscheint sie sehr schnell bei der Fleischfäulnis. Diese Beobachtung hat Salkowski durch seinen Schüler Blumenthal²⁾ genauer verfolgen lassen. Die Versuche Blumenthals bestätigten die Beobachtung Salkowskis vollständig. Blumenthal³⁾ kam in seiner Arbeit schließlich zu folgendem Schlußsatz: «Die Organe enthalten in physiologisch frischem Zustande keine Bernsteinsäure. Wo sie sich in diesen findet, ist sie als postmortales Produkt anzusehen: sie ist also kein Stoffwechselprodukt der animalen Zellen, sondern der Mikroorganismen». Nach den Anschauungen von Salkowski-Blumenthal ist also die Bernsteinsäure, die sich in Organextrakten nachweisen läßt, lediglich ein Fäulnisprodukt.

Die Ansicht von Salkowski-Blumenthal war bis vor kurzem allgemein herrschend. In letzter Zeit glaubt jedoch Magnus-Levy⁴⁾ den Beweis erbracht zu haben, daß auch bei Ausschluß der Bakterien sich in den tierischen Organen unter gewissen Bedingungen Bernsteinsäure bilden kann. Magnus-Levy hat leider hauptsächlich mit den Lebern verschiedener

1) Zeitschrift f. klin. Medizin, Suppl. zum Bd. 17. S. 77 ff., 1890.

2) Virchows Archiv, Bd. 137, S. 539, Jahrg. 1894.

3) l. c., S. 568.

4) Hofmeisters Beitr., Bd. 2, S. 261—296.

Tiere gearbeitet. Er entnahm dieselben unter aseptischen Kautelen den frisch getöteten Tiere und überließ sie bei 37° C. sich selbst. Dabei zerflossen die Leberstücke sehr schnell, bedeckten sich mit Schaum und stießen reichliche Mengen von Schwefelwasserstoff aus. In derartig veränderten Organen, die frei von Bakterien gewesen sein sollen, hat Magnus-Levy nicht unbeträchtliche Mengen Bernsteinsäure gefunden. Dieselbe soll sich unter dem Einfluß gewisser tierischer Enzyme gebildet haben.¹⁾

Mögen nun die Anschauungen von Salkowski-Blumenthal unbedingt richtig sein, oder durch die Arbeiten von Magnus-Levy eine Einschränkung erfahren, sicher ist Bernsteinsäure in möglichst frischem, tadellosem Fleisch überhaupt nicht oder nur in Spuren vorhanden. Unsere Schlussfolgerung, nach der das Fehlen von Bernsteinsäure im Fleischextrakt ein tadelloses Ausgangsmaterial anzeigt, das reichliche Vorkommen von Bernsteinsäure dagegen ein Ausgangsmaterial erkennen lassen würde, das vor der Verarbeitung längere Zeit gelagert und dabei in mehr oder weniger hohem Grade der Fäulnis resp. «Autolyse» (s. die Fußnote) verfallen sei, schien daher berechtigt.

Wir benutzten für unsere Untersuchungen bisher lediglich Fleischextrakt von Liebigs Kompagnie. Die einzelnen Proben bezogen wir aus einem angesehenen Marburger Delikateßladen. Sie befanden sich alle in den bekannten Originalgefäßen. Namentlich war auch das abschließende Streifenband mit dem Namenszug von Voit und Rubner stets vollkommen unversehrt. Wir achteten hierauf besonders. Es handelte sich also sicher um Proben, wie sie von Liebigs Kompagnie in den Handel gebracht waren. Dieselben mußten neueren Datums sein, jedenfalls sind sie erst nach dem Tode Pettenkofers dargestellt worden, da früher Pettenkofer und Voit das Streifenband zeichneten.

Zu unserer Überraschung fanden wir in allen unter-

1) Die gesamten Vorgänge, die in sterilen Organen zur Bildung von Bernsteinsäure führen können, faßt Magnus-Levy unter der Bezeichnung «Autolyse der Organe» zusammen.

suchten Proben von Liebigs Fleischextrakt Bernsteinsäure, zum Teil in sehr beträchtlicher Menge. Unser Befund steht nicht vereinzelt da. Die Bernsteinsäure ist bereits vor uns öfter im Fleischextrakt verschiedener Herkunft beobachtet worden. Zuerst wurde sie von Weidel¹⁾ in Liebigs Fleischextrakt nachgewiesen. Über ihre Existenz macht Weidel keine Bemerkung, sondern er verzeichnet nur die Tatsache. Später hat sie Salkowski²⁾ aus Fleischextrakt isoliert. Er führte ihre Bildung direkt auf Fäulnis des Fleisches zurück. Dann hat Siegfried³⁾ allerdings wohl unfreiwilliger Weise die Angaben von Weidel und Salkowski bezüglich des Vorkommens von Bernsteinsäure im Fleischextrakt bestätigen müssen. Siegfried isolierte durch seine «Eisenmethode» aus Kemmerichs Fleischextrakt einen höchst merkwürdigen Körper, den er als Phosphorfleischsäure bezeichnete. Die »Phosphorfleischsäure« sollte unter geeigneten Maßnahmen Bernsteinsäure abspalten. Durch einen von uns (Kutscher)⁴⁾ ist bereits an anderer Stelle darauf hingewiesen, daß die Bernsteinsäure, die Siegfried als Spaltungsprodukt der Phosphorfleischsäure erhalten hat, in der Tat nichts anderes gewesen ist, als präformierte Bernsteinsäure, welche Siegfried durch seine «Eisenmethode» ebenfalls fällen mußte (s. auch Fußnote S. 107).

Den gemachten Einwand hat Siegfried nun allerdings durch einen seiner Schüler entkräften lassen wollen. Herr Macleod wies unter seiner Leitung nach,⁵⁾ daß in einigen untersuchten Proben von Fleischextrakt keine Bernsteinsäure vorhanden war. Die Methode, die Macleod benutzte, war übrigens nicht einwandfrei. Doch wir wollen voraussetzen, Macleod hätte mit tadellosen Methoden gearbeitet, dann würden seine Versuche doch nicht beweisen, was Siegfried wünscht. Siegfried ist doch der Meinung, daß die Bern-

1) Liebigs Annalen., Bd. 158, S. 366.

2) Zeitschr. f. klin. Medin. Suppl. z. Bd. 17.

3) Du Bois' Archiv, Physiol. Abt., 1894, S. 402 u. Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 360.

4) Diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 120.

5) Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 557.

steinsäure, die er im Fleischextrakt gefunden, nur der «Phosphorfleischsäure» entstammt. Hätte er dies erweisen wollen, dann hätte er noch zeigen müssen, daß derjenige Fleischextrakt, der nach den Angaben seines Schülers frei von präformierter Bernsteinsäure war, eine «Phosphorfleischsäure» lieferte, die Bernsteinsäure abspaltete. Das hat er nicht getan. Die Arbeit des Herrn Macleod hat also, wir heben dies nochmals hervor, bestenfalls gezeigt, daß es Fleischextrakt geben kann, der frei von Bernsteinsäure ist, nicht aber, daß es «Phosphorfleischsäure» gibt, die Bernsteinsäure abspaltet.

In letzter Zeit hat schließlich Magnus Levy¹⁾ nach Bernsteinsäure in Liebigs Fleischextrakt gesucht und sie darin gefunden.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Forschern hat Blumenthal²⁾ in 50 g Liebigs Fleischextrakt und 150 g Cibils Fleischextrakt vergeblich nach Bernsteinsäure gesucht. Blumenthal hat bei seinen Versuchen sehr brauchbare Methoden, die er in Salkowskis Laboratorium ausgearbeitet hat, benutzt. Er hätte mit denselben, wenn merkliche Mengen von Bernsteinsäure in dem von ihm untersuchten Fleischextrakt vorhanden gewesen wären, dieselben auch isolieren müssen. Seine negativen Resultate sind praktisch deswegen von erheblicher Wichtigkeit, weil sie erweisen, daß Liebigs Kompagnie in der Tat einen Fleischextrakt erzeugen kann, der frei von Bernsteinsäure ist. Wesentlich leichter als die Angaben Blumenthals wiegen jene von Macleod. Auch dieser will, wie bereits gesagt, Fleischextrakt in Händen gehabt haben, der keine Bernsteinsäure enthielt.

Wir selbst wandten zwei von einander etwas abweichende Verfahren an, um die im Fleischextrakt enthaltene Bernsteinsäure zu isolieren.

Verfahren I.

50 g Fleischextrakt wurden in ca. 500 ccm Wasser gelöst, ohne Verlust in einen Ätherextraktionsapparat, ähnlich

1) l. c.

2) l. c. S. 559.

dem, wie er von Huppert¹⁾ zur Ätherextraktion größerer Harnmengen angegeben ist, gebracht, dort mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und nunmehr bis zur Erschöpfung mit Äther extrahiert. Der von Huppert angegebene Extraktionsapparat arbeitet automatisch, er bedarf kaum einer Wartung und hat sich uns ausgezeichnet bewährt. Nur ein kleiner Nachteil haftet ihm an, die Extraktion verläuft langsam. Wir haben zuweilen 14 Tage täglich 4 bis 6 Stunden extrahieren müssen, um 50 g Fleischextrakt völlig zu erschöpfen. Aus dem Ätherextrakt ließen wir bei Zimmertemperatur den Äther verdunsten. Es hinterblieb in allen Fällen ein schwachbräunlich gefärbter Sirup von starkem aromatischen Geruch, der lebhaft an jenen erinnerte, welcher eingedampften Rinderharn auszeichnet. Im Laufe einiger Tage bedeckte sich der Sirup mit einer dünnen Krystallhaut, die aus Drusen von zarten Blättchen und Nadeln einer organischen in Wasser schwer löslichen Substanz bestand.²⁾ Zur freiwilligen Ausscheidung von Bernsteinsäure kam es jedoch nicht.³⁾ Wir nahmen daher den Sirup mit wenig Wasser auf, filtrierten die schwer löslichen Krystalle ab, machten das Filtrat mit Ammoniak schwach alkalisch und fällten mit neutraler 20 %iger Silbernitratlösung. Den reichlichen Niederschlag, den wir stets erhielten, saugten wir auf der Filterplatte ab, wuschen ihn mit Wasser und Alkohol aus und zerlegten ihn im Bechergläschen mit heißer, überschüssiger Salzsäure. Vom Chlorsilber

1) Analyse des Harns, S. 185.

2) Magnus Levy hat die oben erwähnte Substanz wahrscheinlich bereits in Händen gehabt. Bei Verarbeitung von 20—30 kg Liebigs Fleischextrakt würde man genügende Mengen erhalten, um sie zu identifizieren. Sie scheint mit Wasserdämpfen flüchtig zu sein. Wenigstens schien uns ihre Menge abzunehmen, wenn wir den Sirup wiederholt mit Wasser aufnahmen und eindampften, dabei verlor sich auch der an Rinderharn erinnernde Geruch des Sirups.

3) In dem Versuch, über den Magnus-Levy berichtet, schied sich Bernsteinsäure freiwillig aus dem Ätherextrakt ab. Darnach muß die verarbeitete Probe außerordentlich reich an Bernsteinsäure gewesen sein, da für gewöhnlich durch die Milchsäure beträchtliche Mengen Bernsteinsäure in Lösung gehalten werden.

wurde abfiltriert. Das Filtrat ließ beim Einengen die Bernsteinsäure etwas gefärbt auskrystallisieren. Wir dampften daher die Masse auf dem Wasserbade zur Trockne ein, nahmen sie mit Wasser auf, wobei geringe Mengen von Schmieren ungelöst zurückblieben, entfärbten die Lösung mit wenig Tierkohle. Nach dem Einengen krystallisierte die Bernsteinsäure nunmehr völlig weiß aus. Sie wurde abgesaugt, mit wenig Alkoholäther gewaschen, getrocknet und gewogen. Ihr Schmelzpunkt war stets der richtige. Die Ausbeuten an reiner Bernsteinsäure, die wir nach obigem Verfahren erhielten, schwankten in den verschiedenen Versuchen zwischen 0,325 bis 0,882 g Bernsteinsäure.

Verfahren II.

Man könnte vielleicht einwenden, die von uns isolierte Bernsteinsäure sei durch die lange Einwirkung der starken Schwefelsäure aus der «Phosphorfleischsäure», die ja nach Siegfried als Zersetzungsprodukt Bernsteinsäure liefern soll, abgespalten worden. Um dem zu begegnen, sind wir wie folgt vorgegangen. Aus den Arbeiten von Mays¹⁾ war uns bekannt, daß man aus Liebigschem Fleischextrakt die gesamte biuretgebende Substanz, also auch die «Phosphorfleischsäure», durch Ammonsulfat abscheiden kann. Unsere eigenen diesbezüglichen Versuche bestätigen die Angaben von Mays. Wir lösten daher 50 g Fleischextrakt in ca. 300 ccm Wasser, sättigten die Flüssigkeit mit festem Ammonsulfat, filtrierten die ausgesalzene Masse ab,²⁾ wuschen sie mit gesättigter Ammon-

1) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 34, S. 268.

2) Die durch Ammonsulfat ausgesalzene Masse des Fleischextrakts, welche die gesamte «Phosphorfleischsäure» enthalten mußten, habe ich öfter direkt mit überschüssigem Barytwasser digeriert, um die «Phosphorfleischsäure» in ihre Spaltungsprodukte, «Antipepton», Milchsäure und Bernsteinsäure, zu zerlegen. Der negative Ausfall aller Versuche machte schon die Existenz der «Phosphorfleischsäure» sehr unwahrscheinlich. Ich habe aber schließlich noch, um die «Phosphorfleischsäure» endgültig zu erledigen, häufig folgendes einwandfreie Verfahren eingeschlagen.

sulfatlösung aus und brachten das Filtrat nebst Waschflüssigkeit in den Ätherextraktionsapparat. Die «Phosphorfleischsäure» war bei dieser Versuchsanordnung ganz auf dem Filter zurückgeblieben. Im übrigen gingen wir vor wie im Verfahren I. Das Filtrat im Extraktionsapparat wurde also mit Schwefelsäure angesäuert und die Bernsteinsäure aus ihm, wie im vorstehenden geschildert, isoliert. Die Ausbeute an Bernsteinsäure nach Verfahren II war ähnlich wie nach Verfahren I, stieg aber in einem Falle auf 1,103 g Bernsteinsäure an. Verfahren II hat mancherlei Vorteile vor Verfahren I. Namentlich verläuft die Extraktion schneller und wahrscheinlich auch vollständiger. Außerdem wird die Bildung eines Magma, unter der wir zuweilen bei Verfahren I zu leiden hatten, vermieden. Wir müssen übrigens hervorheben, daß bereits Magnus-Levy¹⁾ das Ammonsulfat angewandt hat, um Substanzen, welche das Ausäthern seiner Organextrakte erschwerten, zu beseitigen.

Wir wollen nunmehr unsere Resultate mit den zur Zeit gültigen Theorien über die Bildung der Bernsteinsäure etwas näher verknüpfen. Wie bereits hervorgehoben, sind Salkowski

Die durch Ammonsulfat ausgesalzene Masse habe ich in Wasser gelöst. Die Lösung habe ich genau nach der «Eisenmethode» Siegfrieds behandelt und «Carniferrin» daraus dargestellt. Das Carniferrin war völlig identisch mit dem «echten Carniferrin Siegfrieds», nur war bei seiner Darstellung die Beimengung der im Fleischextrakt präformiert vorhandenen Milchsäure und Bernsteinsäure vermieden. Das «Carniferrin» habe ich weiter genau nach den Angaben von Siegfried mit Barytwasser behandelt und aus seinen Spaltungsprodukten Milchsäure und Bernsteinsäure darzustellen versucht. Doch alle Mühe war umsonst. Nach diesen Untersuchungen ist das «Carniferrin Siegfrieds» nichts weiter als ein Gemenge heterogener Substanzen, die Siegfried mit seiner «Eisenmethode» niederschlägt. Unter diesen heterogenen Substanzen findet sich auch Bernsteinsäure und Fleischmilchsäure. Siegfried aber ist einem Irrtum zum Opfer gefallen, als er die aus seinem «Carniferrin» isolierte im Fleischextrakt präformiert vorhandene Bernsteinsäure und Milchsäure als Spaltungsprodukte eines chemischen Individuums der «Phosphorfleischsäure» beschrieb. Ein derartiges chemisches Individuum ist zweifellos überhaupt nicht im Fleischextrakt vorhanden.

Kutscher.

¹⁾ l. c.

und Blumenthal auf Grund ausgedehnter Versuche zum Schluß gekommen, daß Bernsteinsäure, die sich im Fleisch resp. Fleischextrakt vorfindet, stets der Fleischfäulnis ihre Entstehung verdankt. Gestützt auf die Arbeit Blumenthals, können wir weiter leicht berechnen, welche Mengen von stark faulendem Fleisch in den von uns untersuchten Proben mit zur Verwendung gekommen sein müßten. Nach Blumenthal entstehen unter den günstigsten Bedingungen aus einem Kilo Rindfleisch bei 48stündiger Fäulnis 1,8 g Bernsteinsäure. Benutzen wir diese Zahlen, dann ergibt sich für unsere Versuche folgendes: Wir haben bei der Verarbeitung von je 50 g Fleischextrakt 0,325 bis 1,103 g Bernsteinsäure gefunden. Dieselben würden 180 bis 612 g stark faulendem Fleisch entsprechen. Es müßten also bei der Darstellung des von uns untersuchten Fleischextraktes auf je 50 g Extrakt 180—612 g stark faulendes Fleisch verwandt worden sein.

Noch ungünstiger würden sich wahrscheinlich die Verhältnisse gestalten, wenn wir die Anschauung von Magnus-Levy unserer Betrachtung zugrunde legen würden: denn bei der Autolyse wird schwerlich mehr, eher weniger an Bernsteinsäure gebildet, als bei der Fäulnis. Nach der Schilderung von Magnus-Levy gehen die Organe bei der Autolyse aber sehr schnell in einen Zustand über, der sie widerlich und zum Genuß unfähig macht. Die Verwertung von Fleisch, das der Autolyse unterworfen und dadurch reich an Bernsteinsäure geworden ist, zur Darstellung von Fleischextrakt würde sich also sicher ebenfalls verbieten.

Jede der beiden Theorien, die zur Zeit das Vorkommen der Bernsteinsäure im Fleischextrakt erklären, würde uns demnach zu einem Urteil drängen, das für alle von uns untersuchten Proben von Liebigs Fleischextrakt ungünstig lauten müßte. Ein derartiges Urteil, das den Geschäftsbetrieb von Liebigs Kompagnie schwer schädigen könnte, abzugeben, liegt uns fern, da der ausgezeichnete Ruf dieser Gesellschaft wohl hinlängliche Garantie dafür bietet, daß bei ihr zur Darstellung des Fleischextraktes nur tadelloses Ausgangsmaterial verwandt wird.

Wir müssen daher die Frage, woher die von uns im Fleischextrakt gefundenen reichlichen Mengen Bernsteinsäure stammen, noch offen lassen. Ebenso müssen wir späteren Untersuchungen die Entscheidung anheim geben, ob sich die Bernsteinsäure, dieser so leicht isolierbare und erkennbare Körper, eignen wird, den Maßstab für die Güte des zur Darstellung von Fleischextrakt verwandten Ausgangsmaterials abzugeben.
