

Ozonisation des Ketons  $C_{13}H_{22}O$ .

0,2 g Keton wurden in 10 cm<sup>3</sup> Kohlenstofftetrachlorid ozonisiert. Dabei konnte unter den flüchtigen Spaltprodukten Formaldehyd über das p-Nitrophenylhydrazen nachgewiesen werden. Der Schmelzpunkt des zweimal umkristallisierten Produktes lag bei 177—178°.

$C_7H_7O_2N_3$	Ber. C 50,91	H 4,27%
	Gef. „ 51,19	„ 4,19%

Der Mischschmelzpunkt mit einem Vergleichspräparat lag bei der gleichen Temperatur. Das nicht flüchtige Produkt der durch Erhitzen mit Wasser durchgeführten Ozonidspaltung wurde in Äther aufgenommen und mit Sodalösung gewaschen. Der Siedepunkt des nach dem Verdampfen des Äthers erhaltenen Öls lag bei 130—140° (10 mm). Das daraus hergestellte Disemicarbazone schmolz nach dem Umkristallisieren aus Methanol bei 213—214°.

3,660 mg Subst. gaben	7,32 mg $CO_2$	und 2,66 mg $H_2O$
2,170 mg Subst. gaben	0,528 cm <sup>3</sup>	$N_2$ (19°, 714 mm)
$C_{14}H_{26}O_2N_6$	Ber. C 54,16	H 8,45 N 27,09%
	Gef. „ 54,55	„ 8,13 „ 26,71%

Die Mischprobe mit dem Disemicarbazone vom Smp. 210—211° des Diketons, das bei der Ozonisation des Ambreins<sup>1)</sup> erhalten worden war, zeigte keine Schmelzpunktsdepression.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

## Zusammenfassung.

Aus den flüchtigen Bestandteilen des grauen Ambras wurde Dihydro- $\gamma$ -jonon isoliert.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 120. Zur kolorimetrischen Milchsäurebestimmung

von R. Markus.

(18. III. 48.)

## I. Bestimmung in reinen Milchsäure- und Laactatlösungen.

Zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure stehen dem Analytiker u. a. folgende Methoden zur Verfügung:

Zunächst die Permanganatmethode von Firth und Charnass<sup>2)</sup>, welche im Laufe der Zeit wesentlich verbessert wurde. Sie beruht darauf, dass eine siedende, verdünnte Milchsäurelösung in Gegenwart von Schwefelsäure und Mangan(II)-Ionen durch eine langsam zutropfende, stark verdünnte Permanganatlösung zu Acetaldehyd oxydiert wird. Der jeweils gebildete Acetaldehyd destilliert kontinuierlich in eine gut gekühlte Vorlage über, in welcher er durch Natriumhydrogensulfit gebunden wird. Nachdem der Aldehyd aus der Hydrogensulfitverbindung mit Natriumhydrogencarbonat in Freiheit gesetzt ist, kann er jodometrisch titriert werden.

<sup>1)</sup> L. Ruzicka und F. Lardon, Helv. **29**, 920 (1946).

<sup>2)</sup> O. Firth und D. Charnass, Biochem. Z. **26**, 199 (1910).

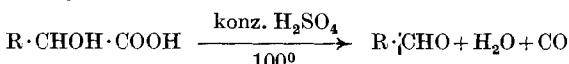
Es hat sich gezeigt, dass die Oxydation der Milchsäure bis zur Acetaldehydstufe durch den sekundär aus  $\text{KMnO}_4$  und Mangan(II)-salz entstehenden Braунstein ( $\text{MnO}_2$ ) erfolgt<sup>1)</sup> <sup>2)</sup>. Kaliumpermanganat selbst oxydiert Milchsäure weiter bis zu Essigsäure, eine Erscheinung, welche die früheren, recht erheblichen Verluste der Permanganatmethode erklärliech macht. Ihre Aufdeckung führte zur Anwendung einer Apparatur<sup>3)</sup><sup>4)</sup>, welche die direkte Berührung des Aldehyds mit Kaliumpermanganat auf ein Minimum beschränkte und welche die Genauigkeit der *Fürth-Charnass'schen* Methode wesentlich erhöhte.

Der Nachteil der Permanganatmethode liegt in der zeitraubenden Bestimmung mittels einer Spezialapparatur, die sich für Serienbestimmungen nicht gut eignet. Ausserdem bleibt die Empfindlichkeitsgrenze auf 0,05 mg beschränkt.

Ein anderer Weg, die Milchsäure quantitativ zu bestimmen, besteht darin, dass sie durch Chromsäureoxydation in saurem Milieu in Essigsäure übergeführt wird, welche man nach anschliessender Wasserdampfdestillation alkalimetrisch titriert.

Diese Methode wurde zuerst von *Lepper* für die Milchsäurebestimmung in Gärftutter (Silage)-Extrakten entwickelt<sup>5)</sup><sup>6)</sup>. Auch diese Methode ergibt in reinen Fettsäure-Milchsäuregemischen sehr gute Resultate. Dagegen zeigt die Milchsäurebestimmung nach *Lepper* in biologischen Flüssigkeiten, z. B. in Gärftuterextrakten, sehr oft starke Abweichungen gegenüber der Permanganatmethode, welcher Umstand uns dazu führte, eine dritte, im folgenden zu beschreibende, kolorimetrische Methode zu prüfen.

Eine ganze Anzahl kolorimetrischer Bestimmungen der Milchsäure beruht auf der Farbreaktion von *Denigès*<sup>7)</sup>, die zunächst für den qualitativen Nachweis der Milchsäure diente. Diese Reaktion benützt die Eigenschaft der  $\alpha$ -Oxycarbonsäuren, mit konzentrierter Schwefelsäure in der Hitze Ameisensäure abzuspalten und in den nächsttieferen Aldehyd überzugehen; die Ameisensäure zerfällt dabei in Kohlenmonoxid und Wasser:



Setzt man dem Aldehyd ein Phenol oder einen Phenoläther z. B. Guajakol (Monomethyläther des Brenzcatechins) zu, so entsteht in genügender Verdünnung ein rein rosa-roter Farbstoff, der sich gut kolorimetrieren lässt<sup>8)</sup>. Die Reaktion bildet die Grundlage einer Methode, die für die quantitative Bestimmung der Milchsäure im Blutserum beschrieben wurde<sup>9)</sup>.

Auch mit Veratrol (Dimethyläther des Brenzcatechins) entsteht, unter den gleichen Bedingungen wie oben, eine Rottfärbung, die sich ebenfalls für die quantitative Bestimmung der Milchsäure eignet<sup>10)</sup>. In letzter Zeit wurde dieses von *Mendel* ausgearbeitete Verfahren in wenig abgeänderter Form erneut in Vorschlag gebracht<sup>11)</sup><sup>12)</sup>.

<sup>1)</sup> *T. E. Friedemann, M. Colonio und P. A. Shaffer, J. Biol. Chem.* **73**, 335 (1927).

<sup>2)</sup> *T. E. Friedemann und A. J. Kendall, J. Biol. Chem.* **82**, 23 (1929).

<sup>3)</sup> *E. Lehnartz, Z. physiol. Ch.* **179**, 1 (1928).

<sup>4)</sup> *H. Hostettler, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.* **25**, 107 (1934).

<sup>5)</sup> *W. Lepper, Z. Tierernährung und Futtermittelkunde* **1**, 187 (1938).

<sup>6)</sup> *P. Fuchs, Ch. Z.* **68**, 163 (1944).

<sup>7)</sup> *G. Denigès, Bl. [4] 5, 647 (1909).*

<sup>8)</sup> Es ist nicht abgeklärt, für die analytische Anwendung jedoch gleichgültig, ob der entstehende Acetaldehyd unter den genannten Bedingungen in seiner cyklischen Paraldehydform mit den Phenolen einen Diphenylmethanfarbstoff bildet.

<sup>9)</sup> *G. A. Harrrop, jr., C.* **1921**, IV, 93.

<sup>10)</sup> *B. Mendel und I. Goldscheider, Bioch. Z.* **164**, 163 (1925).

<sup>11)</sup> *W. Diemair, H. Riffart und K. Mollenkopf, Z. anal. Ch.* **119**, 189 (1940).

<sup>12)</sup> *S. B. Barker, Am. J. of Physiology* **129**, P, 305 (1940).

Weitere Arbeiten beziehen sich auf eine Reihe ähnlicher, der quantitativen Milchsäurebestimmung dienender Reaktionen, wie mit Codein<sup>1)</sup> (gelb), Thiopen<sup>2)</sup><sup>3)</sup> (kirschrot), Hydrochinon<sup>3)</sup> (orange) und vor allem mit p-Oxydiphenyl (violett). Die Farbreaktion mit p-Oxydiphenyl erlaubt noch einen qualitativen Nachweis von 0,0005 mg Milchsäure<sup>4)</sup>. Sie wurde erst vor kurzer Zeit für quantitative Messungen verwendet<sup>5)</sup><sup>6)</sup>. Neuerdings gelang es, ihre Empfindlichkeit derart zu verbessern, dass noch 0,0001 mg (= 0,1 γ) Milchsäure quantitativ nachweisbar sind<sup>7)</sup>.

Für unsere Untersuchungen, die sich in erster Linie auf die Milchsäurebestimmung von Gärfutterproben bzw. auf wässrige Gär-futterextrakte beziehen sollten, war der Empfindlichkeitsbereich der weiter unten beschriebenen Guajakolmethode gerade passend. Es darf angenommen werden, dass Veratrol und p-Oxydiphenyl in ähnlicher Weise verwendet werden können wie Guajakol.

Alle bisherigen Veröffentlichungen, welche die Verwendbarkeit der Guajakolmethode beschreiben, gehen im wesentlichen von der genannten Farbreaktion von *Denigès*<sup>8)</sup> aus. Nach ihnen setzt man der zu untersuchenden Milchsäurelösung konz. Schwefelsäure zu und erhitzt sie hierauf in einem siedenden Wasserbad (z. B. 2 Minuten lang), kühlt ab und gibt nach einer bestimmten Zeit zum abgekühlten Gemisch eine alkoholische Guajakollösung hinzu. Nach Ablauf einer weiteren Wartezeit wird die maximal entwickelte rote Farbe im Kolorimeter oder im Stufenphotometer<sup>9)</sup> gemessen.

Da es sich hier um eine Reaktion zwischen wässriger Milchsäurelösung und konz. Schwefelsäure handelt, wird durch das Zusammenbringen beider Reagenzien schon vor dem Kochen im Wasserbad Wärme frei, wodurch das für die genaue Messung unerlässliche Einhalten gleichbleibender Erhitzungsdauer schon im vornherein Schwierigkeiten bereitet. Umständlich ist auch die gleichmässige Dosierung der konz. Schwefelsäure mittels einer Vollpipette. Die zuerst genannte Schwierigkeit kann man durch vorherige Eiskühlung der Reagenzien beheben<sup>10)</sup><sup>11)</sup>.

<sup>1)</sup> *L. Servantie*, C. r. Soc. Biol. **92**, 700 (1925).

<sup>2)</sup> *W. M. Fletcher* und *F. G. Hopkins*, J. of Physiology **35**, 247 (1927).

<sup>3)</sup> *Z. Dische* und *D. László*, Bioch. Z. **187**, 344 (1927).

<sup>4)</sup> *E. Eegrive*, Z. anal. Ch. **95**, 323 (1933).

<sup>5)</sup> *B. F. Miller* und *J. A. Muntz*, J. Biol. Chem. **126**, 413 (1938).

<sup>6)</sup> *R. H. Koenemann*, J. Biol. Chem. **135**, 105 (1940).

<sup>7)</sup> *S. B. Barker* und *W. H. Summerson*, J. Biol. Chem. **138**, 535 (1941).

<sup>8)</sup> *Denigès*, l. c.

<sup>9)</sup> Die maximale Auslöschung liegt beim Grünfilter S 53 (Photometerlampe). Die Extinktionskurve verläuft in diesem Bereich, dem *Lambert-Beer*'schen Gesetze folgend, fast geradlinig (siehe *Diemair*, l. c.). Allein die mangelhafte Überdeckung der roten Reaktionsfarbe durch das Grünfilter machte die Ablesung unsicher, weshalb wir zur Verwendung des Blauvioletfilters, S 43 übergingen. Das Filter S 43 liefert zwar eine nicht so gerade verlaufende Auslöschungskurve wie das Filter S 53, doch erlaubt es, neben einer genaueren Ablesung einen grösseren Konzentrationsbereich zu überblicken.

<sup>10)</sup> *Mendel* und *Goldscheider*, l. c.

<sup>11)</sup> *S. B. Barker*, l. c.

Indem wir die nachfolgende, zeitlich genau unterteilte Operation wählten, konnten wir die umständliche Eiskühlung der Reagenzien umgehen. Die konz. Schwefelsäure wurde einem eigens zu diesem Zwecke hergestellten Doppelhahntrichter mit Feuchtigkeitsabschluss entnommen. Der Trichter wurde auf 5,0 cm<sup>3</sup> eingestellt. Als Wasserbad benutzten wir ein in siedendes Wasser hineinhängendes Paraffinbad, worin das mit der Probe beschickte Reagenzglas ruhig und gleichmässig erwärmt werden konnte<sup>1)</sup>.

Unser, eine gleichmässige Farbentwicklung sicherstellendes Vorgehen hat sich auch bei einer anderen stufenphotometrischen Messmethode, die wir ebenfalls seit einigen Jahren in unserem Laboratorium ausführen, sehr gut bewährt<sup>2)</sup>.

### Experimenteller Teil.

Reagenzien: 5-proz. alkoholische Guajakollösung.  
Reine konz. Schwefelsäure pro analysi.  
Standardlactatlösung.

Besondere Sorgfalt verlangt die Herstellung der Guajakollösung. Guajakol, kryst. „Kahlbaum“ muss im Vakuum farblos destilliert werden, da es in der Regel durch Oberflächenoxydation röthlich gefärbt ist. Auch das flüssige Guajakol, Ph. H. V. „Siegfried“ ist verwendbar, es muss jedoch vorher durch Vakuumdestillation einige Male sorgfältig rektifiziert werden. Man wählt 10,00 g reines, frisch destilliertes Guajakol ein und löst es in 200,0 cm<sup>3</sup> reinem, 96-proz. Alkohol im Messkolben. Im Dunkeln aufbewahrt, bleibt die Lösung jahrelang brauchbar.

Nur reinstes Schwefelsäure pro analysi ist verwendbar. Man überzeugt sich in einer Blindprobe, ob Schwefelsäure und Guajakol miteinander keine Farbreaktion geben. Tritt z. B. eine bläulich-grüne oder sogar eine bräunliche Färbung auf, so ist die betreffende Schwefelsäure nicht brauchbar. Schon Spuren von NO' oder NO<sub>2</sub>' stören die Farbreaktion sehr stark<sup>3)</sup><sup>4)</sup>.

Zur Herstellung der Standardmilchsäurelösung kann man ein Milchsäurepräparat von hoher Konzentration verwenden und durch ein besonderes Titrationsverfahren den wahren Milchsäuregehalt der Lösung bestimmen<sup>5)</sup>. Wir zogen diesem Vorgehen die direkte Einwaage fester Lactate vor.

Durch direkte Einwage von 6,8462 g Calciumlactat (5 Krystallwassermoleküle) ohne Vortrocknung, oder durch Einwage von 4,2632 g Lithiumlactat (wasserfrei durch 6-stündiges Trocknen bei 110°) und Auflösen in 1 Liter Wasser stellt man eine Standardlactatlösung her, welche einer 0,4-proz. Milchsäurelösung entspricht. Der Zusatz von ca. 1 g Quecksilberchlorid verhütet bei sorgfältiger Aufbewahrung Schimmelbildung.

Aus dieser Standardlactatlösung bereitet man sich, zur Aufstellung der Eichkurve, durch entsprechende Verdünnung eine Konzentrationsreihe von 0,020—0,30-proz. Milch-

<sup>1)</sup> Wird von der Methode eine grössere Empfindlichkeit als die von uns angestrebte verlangt, so ist eine vorherige Eiskühlung der Reagenzien nicht zu umgehen. In diesem Falle ist die Einhaltung der Vorschriften von Barker und Summerson, l. c., zu empfehlen.

<sup>2)</sup> Phosphorbestimmung im Blutserum nach Benedict und Theis, J. Biol. Chem. **61**, 63 (1924).

<sup>3)</sup> Mendel und Goldscheider, l. c.

<sup>4)</sup> J. A. Russel, J. Biol. Chem. **156**, 463 (1944).

<sup>5)</sup> Wegen Lactylmilchsäurebildung ist die alkalimetrische Titration starker Milchsäurelösungen nicht ohne weiteres zulässig, vgl. Fritz Kutter, Die Prüfung der Milchsäure, Diss. ETH. 1926.

säure. Zweckmässigerweise bestimmt man auf der Kurve etwa 10 bis 15 Punkte; da der untere Teil der Extinktionskurve parabolisch verläuft, sollten auf die niedrigeren Milchsäurekonzentrationen mehr Bestimmungen fallen. (Vgl. Fig. 1.)

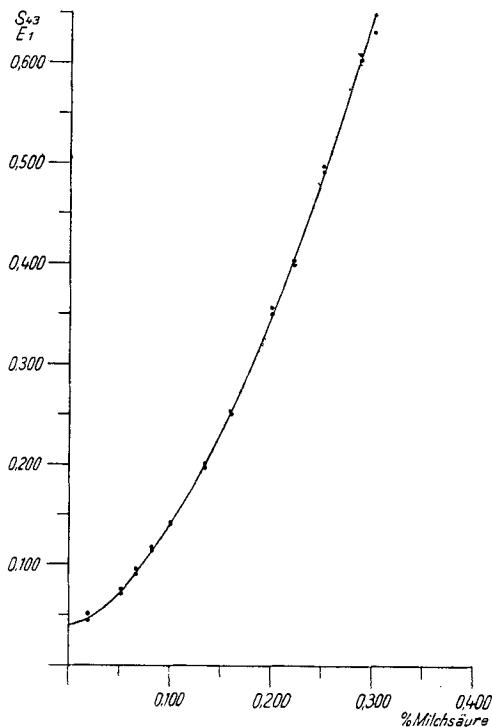


Fig. 1.

#### Messmethodik.

Man füllt mit einer kalibrierten Ablasspipette  $0,5 \text{ cm}^3$  der zu untersuchenden Milchsäurelösung in ein gewöhnliches Reagenzglas (ca. 15 mm Innendurchmesser) ab und beginnt mit der Stoppuhr die Zeit zu messen. Bei 40 Sekunden lässt man aus dem Doppelhahntrichter genau  $5,0 \text{ cm}^3$  Schwefelsäure zufließen, alsdann schüttelt man von 50 bis 55 Sekunden den Inhalt gehörig durch. Genau nach 1 Minute stellt man das Reagenzglas in das mit flüssigem Paraffin beschickte Rohr des lebhaft siedenden Wasserbades. Bei  $2'55''$  nimmt man das Reagenzglas wieder heraus, wischt es mit einem Tuch kurz vom anhaftenden Paraffinöl ab, um es genau nach 3 Minuten in ein mit kaltem Wasser gefülltes Becherglas zu stellen.

Nach einer dreiminutigen Kühlung, also nach 6 Minuten, setzt man  $0,40 \text{ cm}^3$  der Guajakollösung zu, schüttelt noch 10 Sekunden lang durch und lässt hierauf den Farbstoff sich etwa  $1\frac{1}{2}$  Stunden lang entwickeln.

Nach 90 Minuten<sup>1)</sup> misst man im *Pulfrich'schen* Stufenphotometer mit dem Blauviolettfilter S 43 bei  $1,0 \text{ cm}$  Schichtdicke gegen destilliertes Wasser als Kompensations-

<sup>1)</sup> Die Extinktionswerte werden schon nach Ablauf von 60 Minuten konstant. Wir wählten willkürlich 90 Minuten, weil dieses Zeitintervall uns die Bestimmung einer grösseren Serie erlaubte.

flüssigkeit die Extinktion<sup>1)</sup>). Die auf diesem Wege verfertigte Extinktionskurve erlaubt die quantitative Bestimmung der Milchsäure in reinen Lösungen mit einem maximalen Fehler von  $\pm 3\%$ <sup>2)</sup>. Der mittlere Fehler betrug in unseren Versuchen  $\pm 1,42\%$ . Da die Vorbereitung einer Farbentwicklung etwa 7 Minuten beansprucht, ist es mit einiger Übung möglich, in 3 Stunden eine Serie von 12 Bestimmungen auszuführen. Der praktische Messbereich liegt zwischen 0,05—0,25% Milchsäure, was auf eine Probe von 0,5 cm<sup>3</sup> umgerechnet, 0,5—2,5 mg Milchsäure je Probe bedeutet.

## II. Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten. Eine analytische Anwendung von säuredurchlässigen Kationen-Austauscherkolonnen.

In Flüssigkeiten biologischen Ursprungs (Körperflüssigkeiten, Pflanzenextrakten) kann die Bestimmung der Milchsäure grundsätzlich nach der gleichen Methode erfolgen, wie wir sie im ersten, auf reine Milchsäurelösungen Bezug nehmenden Teil unserer Veröffentlichung beschrieben haben. In solchen Flüssigkeiten sind jedoch in der Regel außer der Milchsäure noch eine Reihe weiterer organischer Substanzen enthalten, die unter den von uns für reine Milchsäurelösungen vorgesehenen Bedingungen mit Guajakol ebenfalls Farbreaktion zeigen. Schon *Denigès* hat gezeigt, dass seine Farbreaktion mit Guajakol sowohl bei Milchsäure als auch bei Glykolsäure eintritt<sup>3)</sup>.

Die meisten Autoren der einschlägigen Publikationen sind vor das Problem gestellt worden, Substanzen, die das Ergebnis der kolorimetrischen Milchsäurebestimmung verfälschen, zu eliminieren, doch kamen sie über die mehr oder weniger vollständige Entfernung von störenden Zuckern und Eiweißsubstanzen nicht hinaus. In neuerer Zeit wurden von amerikanischen Forschern umfangreiche Tabellen über Verbindungen veröffentlicht, welche die kolorimetrische Milchsäurebestimmung mit p-Oxydiphenyl beeinträchtigen. Der Grund hierfür war, dass sie die Spezifität der Farbreaktion durch Anwendung dieses Phenols zu steigern versuchten, was teilweise auch gelang, ohne eine restlos befriedigende Elimination störender Nebenreaktionen erzielen zu können<sup>4)</sup>.

Wir selber versuchten zunächst in Anpassung an die von uns gestellte Aufgabe (Untersuchung von Gärfutterextrakten), einzelne Substanzen, die bei der Anwendung der Guajakol-methode als störend in Betracht gezogen werden mussten, in dem zu analysierenden Medium zu identifizieren. Dabei gelang es uns, Brenztraubensäure nachzuweisen, welche die Farbreaktion mit Guajakol empfindlich stört. Außerdem prüften wir einige als Modellsubstanz gewählte einfache organische Körper bezüglich ihrer Farbreaktion mit Guajakol. U. a. wandten wir unsere Aufmerksamkeit verschiedenen, beim Abbau von Aminosäuren entstehenden Substanzen zu, da solche bei der

<sup>1)</sup> Die Ablesungen sind genauer und ermüden die Augen weniger, wenn man zuerst die höheren Extinktionen, d. h. die dunkleren Nüancen mißt und erst nachher zu den helleren Farben übergeht.

<sup>2)</sup> Diese empirische Kurve ließ sich in unserem Falle mit der Gleichung der Parabel  $y = 4x^{1,6} + 0,04$  in gute Deckung bringen, so daß eine direkte Berechnung der Milchsäurewerte aus der Extinktion möglich ist.

<sup>3)</sup> *G. Denigès*, Bl. [4] 5, 647 (1909).

<sup>4)</sup> *S. B. Barker* und *W. H. Summerson*, J. Biol. Chem. 138, 535 (1941).

Anwendung der kolorimetrischen Milchsäurebestimmung als besonders störend in Frage kommen konnten.

Aus Spalte 2 der nachstehenden Tabelle ist ersichtlich, dass Fettsäuren, Alkohole, Ketone und Dicarbonsäuren mit Guajakol gar keine Farbreaktion geben. Schwach, jedoch deutlich stören die Eiweißstoffe und Aminosäuren, ferner die  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketosäuren. Ausgesprochene Farbreaktionen gaben erwartungsgemäß die  $\alpha$ -Oxysäuren (Milchsäure und Homologen) ferner sämtliche geprüften Kohlehydrate. Am stärksten störten die Aldehyde und die  $\alpha$ -Ketosäuren. Die Intensität der Farbreaktion dieser Körper übertrifft stark diejenige der  $\alpha$ -Oxysäuren. Bei den Ketosäuren nahm die Farbintensität mit dem Abstand der Carbonylgruppe von der Carboxylgruppe rasch ab:  $\delta$ -Ketosäuren gaben kaum noch eine messbare Farbreaktion.

Für unsere Beobachtungen kann folgende Erklärung in Frage kommen: Es muss angenommen werden, dass es zur Bildung einer Farbreaktion mit Guajakol unter den im I. Teil unserer Arbeit genannten Bedingungen eines Aldehydes bedarf. Dieser ist entweder als reaktionsfähiger Aldehyd bereits zugegen oder er bildet sich unter der Einwirkung der konz. Schwefelsäure aus  $\alpha$ -Oxysäuren, unter Umständen auch aus sonstigen reaktionsfähigen Körpern.

Tatsächlich reagieren Aldehyde und  $\alpha$ -Ketosäuren mit Guajakol bedeutend energischer als  $\alpha$ -Oxysäuren. Hieraus ergibt sich eine brauchbare qualitative Unterscheidungsmöglichkeit zwischen  $\alpha$ -Oxysäuren einerseits, Aldehyden, Ketosäuren und auch Kohlehydraten andererseits, indem man die Guajakolprobe in der Kälte anwendet. Setzt man zu einer mit Eis gekühlten Probe ( $0,5 \text{ cm}^3$ ) im Reagensglas die übliche Menge konz. Schwefelsäure ( $5,0 \text{ cm}^3$ ) vorsichtig zu und mischt in der Kälte so durch, dass dabei keine nennenswerte Erwärmung erfolgt, so reagieren nach Zugabe von  $0,4 \text{ cm}^3$  einer 0,5-proz. alkoholischen Guajakollösung sämtliche oben erwähnten Körper, mit Ausnahme der  $\alpha$ -Oxysäuren, unter sofortiger Farbreaktion.  $\alpha$ -Oxysäuren (z. B. Milchsäure) reagieren dagegen erst nach etwa 10 Minuten unter allmählich zunehmender Rosafärbung. Die Trägheit der Reaktion der Oxysäuren in der Kälte wurde schon recht früh erkannt<sup>1)</sup> und in neuerer Zeit wieder erwähnt<sup>2)</sup>.

Das Ergebnis der in der Kälte vorgenommenen Prüfung mit Guajakol wurde in Spalte 1 der Tabelle angeführt.

Die für die Reaktionen ohne Vorbehandlung gewählte Konzentration der Prüfsubstanzen betrug 2% (Ergebnisse in Spalte 1 und 2 der Tabelle). Bei den Reaktionen nach der Vorbehandlung wiesen dagegen die geprüften Substanzen eine Konzentration von 0,2% auf.

<sup>1)</sup> B. Mendel und I. Goldscheider, Bioch. Z. 164, 163 (1925).

<sup>2)</sup> S. B. Barker und W. H. Summerson, J. Biol. Chem. 138, 535 (1941).

## Die Farbreaktion mit Guajakol.

Testsubstanzen nach Körperklassen geordnet	Reaktion ohne Vorbehandlung		Reaktion nach Vorbehandlung		
	1) kalt	2) in der Wärme	3) Entzuk- kerung und Ent- eiweis- sung	4) Säure- hydrolyse, Entzuk- kerung und Ent- eiweis- sung	5) Säure- hydrolyse, Entzuk- kerung, Entei- weissung und Hy- drierung
<i>Alkohole:</i>					
Methanol . . . . .	—*)	—	—	—	—
Äthanol . . . . .	—	—	—	—	—
n-Octanol . . . . .	—	—	—	—	—
<i>Polyalkohole:</i>					
Glykol . . . . .	—	—	—	—	—
Glycerin . . . . .	—	schwach rosa	—	—	—
Trimethylenglykol . . . . .	—	schwach gelblich	—	—	—
D-Mannit . . . . .	—	—	—	—	—
<i>Fettsäuren:</i>					
Ameisensäure . . . . .	—	—	—	—	—
Essigsäure . . . . .	—	—	—	—	—
Propionsäure . . . . .	—	—	—	—	—
Buttersäure . . . . .	—	—	—	—	—
<i>Ketone:</i>					
Aceton . . . . .	—	—	—	—	—
Methyläthylketon . . . . .	—	—	—	—	—
<i>Kohlehydrate:</i>					
A. Monosaccharide:					
L-Arabinose . . . . .	rot	rot	rosa	—	—
L-Rhamnose . . . . .	rot	rot	gelbrot	gelbrot	rosa
D-Glucose . . . . .	rot	rot	—	—	—
D-Fruktose . . . . .	rot	rot	—	—	—
D-Galactose . . . . .	rot	rot	—	—	—
B. Disaccharide:					
(Trehalosetypus):					
Saccharose . . . . .	rot	rot	rot	—	—
(Gentiobiosetypus):					
Maltose . . . . .	rot	rot	—	—	—
Lactose . . . . .	rot	rot	—	—	—
C. Trisaccharide:					
Raffinose . . . . .	rot	rot	rot	—	—

\*) — bedeutet farblos (keine Farbreaktion).

## Die Farbreaktion mit Guajakol (Fortsetzung).

Testsubstanzen nach Körperklassen geordnet	Reaktion ohne Vorbehandlung		Reaktion nach Vorbehandlung		
	1) kalt	2) in der Wärme	3) Entzuk-kerung und Ent-eiweis-sung	4) Säure-hydrolyse, Entzuk-kerung und Ent-eiweis-sung	5) Säure-hydrolyse, Entzuk-kerung Entei-weissung und Hy-drierung
D. Polysaccharide:					
Stärke (löslich) . . . . .	rot	rot	rosa	—	—
Glykogen . . . . .	rot	rot	—	—	—
Pektin . . . . .	rosa	rot	rosa	—	—
Dicarbonsäuren:					
Oxalsäure . . . . .	—*)	—	—	—	—
Malonsäure . . . . .	—	—	—	—	—
Bernsteinsäure . . . . .	—	—	—	—	—
Oxydicarbonsäuren:					
Äpfelsäure . . . . .	—	gelb	—	—	—
Weinsäure . . . . .	—	rosa	—	—	—
Oxytricarbonsäure:					
Citronensäure . . . . .	—	—	—	—	—
Ketohexonsäurelacton:					
Ascorbinsäure . . . . .	gelb	gelb	—	—	—
Säureamid:					
Harnstoff . . . . .	—	—	—	—	—
Amine:					
Kreatinin . . . . .	—	—	gelbrot	—	—
Diphenylamin . . . . .	—	—	—	—	—
Aminosäuren, Eiweissstoffe:					
Glykokoll . . . . .	—	bräunlich	—	—	—
Glutathion . . . . .	—	bräunlich	—	—	—
Cystein . . . . .	—	bräunlich	—	—	—
Lactalbumin. . . . .	—	bräunlich	—	—	—
Casein . . . . .	—	bräunlich	—	—	—
Eieralbumin . . . . .	—	bräunlich	—	—	—
Oxysäuren:					
Glykolsäure ( $\alpha$ ) . . . . .	—	rosa	rosa	—	—
Milchsäure ( $\alpha$ ) . . . . .	—	rosa	rosa	rosa	rosa
Oxybuttersäure ( $\alpha$ ) . . . . .	—	rosa	rosa	rosa	rosa

\*) — bedeutet farblos (keine Farbenreaktion).

## Die Farbreaktion mit Guajakol (Schluss.)

Testsubstanzen nach Körperklassen geordnet	Reaktion ohne Vorbehandlung		Reaktion nach Vorbehandlung		
	1) kalt	2) in der Wärme	3) Entzuckerung und Enteiweisung	4) Säure-hydrolyse, Entzuckerung und Enteiweisung	5) Säure-hydrolyse, Entzuckerung, Enteiweissung und Hydrierung
<i>Oxysäuren:</i>					
Oxybuttersäure ( $\beta$ ) . . . . .	—*)	—	—	—	—
Oxyisovaleriansäure ( $\beta$ ) . . . . .	—	rot	rosa	rosa	—
<i>Ketosäuren:</i>					
Brenztraubensäure ( $\alpha$ ) . . . . .	gelbrot	gelbrot	gelbrot	gelbrot	rosa
Ketobuttersäure ( $\alpha$ ) . . . . .	gelbrot	gelbrot	gelbrot	gelbrot	rosa
Oxalessigsäure ( $\alpha$ ) . . . . .	gelbrot	gelbrot	gelbrot	rosa	—
Acetessigester ( $\beta$ ) . . . . .	gelb	gelb	gelb	rosa	rosa
Ketotetramethylglutar-säure ( $\beta$ ) . . . . .	—	—	—	—	—
Lävulinsäure ( $\gamma$ ) . . . . .	gelblich	gelblich	—	—	—
Propionylpropionsäure ( $\gamma$ ) . . . . .	rosa	rosa	rosa	rosa	—
Acetondipropionsäure ( $\delta$ ) . . . . .	—	gelblich	—	—	—
<i>Aldehyde:</i>					
Formaldehyd . . . . .	violett	violett	rosa	rosa	—
Acetaldehyd . . . . .	rot	rot	gelbrot	gelb	gelblich
Benzaldehyd . . . . .	gelbrot	gelbrot	—	—	—
Salicylaldehyd . . . . .	rot	rot	—	—	—
Furfurol . . . . .	rot	rot	—	—	—

\*) — bedeutet farblos (keine Farbreaktion)

(Ergebnisse in Spalten 3, 4 und 5 der Tabelle.) Verglichen mit dem Milchsäuregehalt der von uns untersuchten biologischen Flüssigkeiten (Gärfutterextrakte), betrug die Konzentration der in der Tabelle aufgeführten Testsubstanzen bei den Reaktionen ohne Vorbehandlung das 10 bis 20-fache, bei den Reaktionen nach Vorbehandlung annähernd das 1—2-fache.

## Die Entzuckerung.

Zucker stört sowohl die Permanganatmethode nach *Fürth* und *Charnass*<sup>1)</sup> wie auch, und zwar besonders empfindlich, sämtliche kolorimetrischen Milchsäurebestimmungsverfahren. Seine Entfernung

<sup>1)</sup> Bioch. Z. 26, 199 (1910).

beruht auf der Beobachtung *Salkowski's*<sup>1)</sup>, wonach 1 Mol Glucose durch Zusatz von 5 Molen Kupfersulfat und 11 Molen Natronlauge aus wässrigen Lösungen vollständig entfernt werden kann. *Van Slyke*<sup>2)</sup> und später *Clausen*<sup>3)</sup> ersetzten die Natronlauge durch Kalkmilch. Ihre Methode gelangt auch heute noch am meisten zur Anwendung. Falls die zu entzuckernden Lösungen eine saure Reaktion aufweisen, erscheint eine vorherige Neutralisation mit Natronlauge zweckmäßig.

Die Anwendung von Kupfersulfat und Kalkmilch führt zu einer milden Oxydation der Aldosen und Ketosen in mässig alkalischem Milieu, wobei sich schwerlösliche Ca-Salze bilden. Sämtliche Mono- und Polysaccharide mit freien reduzierenden Gruppen werden von der Entzuckerung erfasst. Zu den eliminierbaren Polysacchariden gehören u. a. die Disaccharide des Gentiobiosetypus, wie z. B. Maltose. Die übrigen Polysaccharide (z. B. Saccharose vom Trehalosetypus, ferner Raffinose und Stärke) passieren die Vorbehandlung mehr oder weniger unverändert. (Vgl. Spalte 3 der Tabelle.)

Um mit der Kupfer-Kalkbehandlung sämtliche Kohlehydrate zu erfassen, haben wir eine Säurehydrolyse in der Wärme vorschaltet. Nach der Hydrolyse wird mit starker Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und hierauf mit Kupfersulfat und Kalkmilch entzuckert. Mit dieser im experimentellen Teil genauer beschriebenen Vorbehandlung kann man mit Ausnahme der L-Rhamnose (Methylpentose) sämtliche Kohlehydrate restlos entfernen. (Vgl. Spalte 4 der Tabelle.)

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen<sup>4)</sup> konnten wir erneut feststellen, dass nach Säurehydrolyse und Entzuckerung reiner Milchsäurelösungen keine Depression der Milchsäurewerte eintritt.

### Die Enteiweissung.

Obwohl Eiweiss bei der von *Fürth* und *Charnass* eingeführten Permanganatmethode kaum stört, wurde es von sämtlichen, diese Methode verwendenden Autoren konsequent nach dem *Schenck'schen* Verfahren entfernt<sup>5)</sup>. Dieses Verfahren beruht darauf, dass nach Zusatz von Quecksilberchlorid in salzsaurer Lösung und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff eine Eiweissfällung zustande kommt. Nicht gefällt werden die Aminosäuren, die sich bei der anschliessenden Entzuckerung durch ihre meist violettfarbigen Kupferkomplexverbindungen (Biuret-Reaktion) verraten<sup>6)</sup>. Die *Schenck'sche* Enteiweissung

<sup>1)</sup> *E. Salkowski*, Z. physiol. Ch. **3**, 79 (1879).

<sup>2)</sup> *D. D. van Slyke*, J. Biol. Chem. **32**, 455 (1917).

<sup>3)</sup> *S. W. Clausen*, J. Biol. Chem. **52**, 263 (1922).

<sup>4)</sup> *A. Hansen* und *O. Riesser*, Bioch. Z. **246**, 471 (1932).

<sup>5)</sup> *T. E. Friedemann*, *M. Cotonio* und *P. A. Shaffer*, J. Biol. Chem. **73**, 335 (1927).

<sup>6)</sup> Auch die L-Rhamnose bildet mit Kupfersalzen in alkalischer Lösung ein stark blau gefärbtes Filtrat.

wurde u. a. von *Hirsch-Kauffmann* eingehend beschrieben<sup>1)</sup>. Bei der in neuerer Zeit zur Anwendung gelangenden, im ersten Teil unserer Arbeit erwähnten *Lepper'schen* Destillationsmethode<sup>2)</sup> wird eine besondere Enteiweissung weggelassen, da Eiweiss die Ergebnisse nicht beeinflussen soll. Es wird lediglich mit Kupfersulfat und Kalkmilch entzuckert, wobei immerhin ein Teil des Eiweisses ausgeflockt wird, während ein anderer, nicht koagulierbarer Anteil in Lösung bleibt. Die oft viel zu hohen Milchsäurewerte, die mit der *Lepper'schen* Destillationsmethode gefunden werden, veranlassten uns, auch hier eine Enteiweissung nach *Schenck* zur Anwendung zu bringen. Die damit gemachten Erfahrungen veranlassten uns jedoch zur Schlussfolgerung, dass die erwähnte, unvollkommene Enteiweissung für die zu hohen Resultate der *Lepper'schen* Methode nicht verantwortlich gemacht werden können.

Bei der *kolorimetrischen* Milchsäurebestimmung stören die mit Quecksilberchlorid und Schwefelkohlenstoff nicht fällbaren Aminosäuren durch die bei der Entzuckerung entstehende, farbige Kupferkomplexbildung sehr stark. Andererseits ist die Entzuckerung mit Kupfer-Kalk unerlässlich, da diese Methode bis jetzt durch keine bessere ersetzt werden konnte.

Lässt man jedoch das nach der Entzuckerung erhaltene Filtrat mit den gefärbten Aminosäurekomplexsalzen durch eine säuredurchlässige Kunstharzkolonne (z. B. aus Wofatit KS der *I. G. Farben* bestehend) laufen, so tritt vollständige Entfärbung ein, wobei unter den im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen keinerlei Änderung der Milchsäurekonzentration verursacht wird. Das Filtrat erscheint auch Spurenreaktionen gegenüber vollkommen aminosäurefrei.

In der neueren Literatur sind verschiedene Versuche beschrieben, welche eine Trennung der Aminosäuren mit Hilfe von Ionenaustauschkolonnen bezeichnen<sup>3)</sup><sup>4)</sup>. Für unseren Zweck handelte es sich nicht um die Trennung, sondern darum, mit Hilfe einer geeigneten Kolonne eine vollständige Entfernung der Aminosäuren aus der zu untersuchenden Lösung zu erzielen.

### Die Hydrierung.

Im Verlaufe unserer Untersuchung hat es sich gezeigt, dass eine gründliche Entzuckerung und Enteiweissung als Vorbehandlung für die kolorimetrische Milchsäurebestimmung nicht ausreicht. Wie aus Spalte 4 unserer Tabelle hervorgeht, geben neben den höheren Homologen der Milchsäure ( $\alpha$ -Oxysäuren) noch sämtliche  $\alpha$ -Ketosäuren und

<sup>1)</sup> *H. Hirsch-Kauffmann*, Z. physiol. Ch. **140**, 25 (1924).

<sup>2)</sup> *W. Lepper*, Z. Tierernährung und Futtermittelkunde **1**, 187 (1938).

<sup>3)</sup> *B. S. Clearer, R. A. Hardy und H. G. Cassidy*, Am. Soc. **67**, 1343 (1945).

<sup>4)</sup> *Th. Wieland*, B. **77**, 539 (1944).

Aldehyde störende Farbreaktionen. Die meisten dieser Körper werden durch die beschriebene Vorbehandlung nur teilweise eliminiert und stellen somit bei der kolorimetrischen Milchsäurebestimmung eine bedeutende Fehlerquelle dar.

Gerade in den von uns zu untersuchenden Gärfutterproben musste mit der Gegenwart von Ketosäuren usw. gerechnet werden. So gelang es uns, in einem aus angewelkter Grassilage gewonnenen Extrakt Brenztraubensäure nachzuweisen.

Dass die Entzuckerung mit Kupfer-Kalk nach *Van Slyke* nicht imstande ist, Formaldehyd oder Acetaldehyd restlos zu oxydieren, hat auch *Barker*<sup>1)</sup> festgestellt.

In der Folge versuchten wir, die störenden Aldehyde durch zusätzliche Hydrierung mit Natriumamalgam auszuschalten. In Testlösungen gelang uns dies für Formaldehyd quantitativ, für Acetaldehyd und Brenztraubensäure wenigstens teilweise.

Brenztraubensäure kann sich unter gewissen Bedingungen in verdünnten Milchsäurelösungen bilden. Wir konnten beobachten, dass eine 0,10-proz. Standardlactatlösung, die durch keinerlei Zusätze gegen bakterielle Einwirkung geschützt war, bei Anwendung der Guajakolmethode ihren Extinktionswert während einigen Monaten ständig erhöhte. Nach ca. 3 Monaten zeigte sie eine Extinktion, die einer 0,30-proz. Milchsäurelösung entsprach, wobei sich die Farbreaktion mit Guajakol von rein rosarot in deutlich gelbrot veränderte. Im Gegensatz hierzu ergab eine Kontrollbestimmung mit Hilfe der Permanganatmethode nach *Fürth-Charnass* unverändert den ursprünglichen Gehalt von 0,1% Milchsäure. Diese Erscheinung wurde erklärlich, als es uns gelang, in der Lactatlösung Brenztraubensäure nachzuweisen<sup>2),3)</sup>. Diese, möglicherweise unter bakterieller Einwirkung entstandene Brenztraubensäure konnte durch Hydrierung mit Natriumamalgam quantitativ in Milchsäure zurückverwandelt werden. Nach vollzogener Hydrierung wies die Farbreaktion mit Guajakol wieder eine rein rosa Nüance auf, wobei der Extinktionswert wieder den ursprünglichen Gehalt von 0,10% Milchsäure anzeigen.

Die Extinktion einer 0,10-proz. Brenztraubensäurelösung ist so hoch, dass sie im Stufenphotometer nicht mehr messbar ist. Im Stufenphotometer täuscht Brenztraubensäure, mit Guajakol entwickelt, schätzungsweise die zehnfache Menge an Milchsäure vor. Verwandeln sich beispielsweise nur 3% der vorliegenden Milchsäure in Brenztraubensäure, so zeigt das Gemisch eine Extinktion, die einem scheinbaren Gehalt von nahezu 130% Milchsäure entspricht.

<sup>1)</sup> S. B. Barker, J. Biol. Chem. **137**, 783 (1941).

<sup>2)</sup> F. B. Straub, Z. physiol. Ch. **244**, 117 (1936).

<sup>3)</sup> S. Edlbacher und H. Grauer, Helv. **27**, 157 (1944).

Bei Anwendung der Permanganatmethode ohne Vorbehandlung mit Kupfer-Kalk täuscht vorhandene Brenztraubensäure nach unseren Beobachtungen ungefähr äquivalente Mengen Milchsäure vor. Wie die kolorimetrische Methode mit Guajakol, zeigt dagegen auch das *Lepper'sche* Destillationsverfahren bei Gegenwart von Brenztraubensäure bedeutend mehr Milchsäure an, als der Äquivalenz der Brenztraubensäure entsprechen würde.

Bei Vorbehandlung mit Kupfer-Kalk wird ein beträchtlicher Teil der vorhandenen Brenztraubensäure zurückgehalten, ohne dass sie vollständig entfernt wird, eine Beobachtung, die schon *Barker* gemacht hat<sup>1)</sup>.

Dass überschüssiges Natriumamalgam in alkoholischer Lösung zum Zwecke quantitativer Hydrierung verwendet werden kann, wurde bereits früher beschrieben<sup>2)</sup>. Wir konnten zeigen, dass mit Hilfe von Natriumamalgam gewisse, wenn auch nicht alle Ketosäuren und Aldehyde auch in wässriger Lösung quantitativ hydrierbar sind. Selbstverständlich bleiben dabei die  $\alpha$ -Oxysäuren unverändert.

Aus Spalte 5 der Tabelle ist ersichtlich, wie viele Störsubstanzen durch Hydrolyse, Entzuckerung, Enteiweissung und anschliessende Hydrierung ausgeschaltet werden können.

Uns sämtliche vorbeschriebenen Erfahrungen zunutze machend, versuchten wir nunmehr, die quantitative kolorimetrische Milchsäurebestimmung mit Guajakol nach folgender Vorbehandlung der Lösungen durchzuführen:

- Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure in der Wärme,
- Behandlung mit Kupfer-Kalk,
- Enteiweissung durch Kationenaustauscher, und
- Hydrierung mit Natriumamalgam.

Diese vierfache Vorbehandlung zeigte u. a. folgende Ergebnisse:

Zu einer 0,100% Milchsäure enthaltenden Grundlösung wurden 0,10% Formaldehyd zugesetzt. Dieser, die kolorimetrische Milchsäurebestimmung besonders stark störende Aldehyd wurde unter dem Einfluss der oben angegebenen Vorbehandlung vollständig eliminiert und die Bestimmung der Milchsäure ergab genau die vorgelegte Menge.

In einem weiteren Versuch wurden zu einer 0,111% Milchsäure enthaltenden Grundlösung 0,10% Brenztraubensäure zugesetzt. Die Extinktion der mit Guajakol versetzten Milchsäure-Brenztraubensäurelösung war ohne Vorbehandlung so hoch, dass sie im Stufenphotometer nicht gemessen werden konnte. Nun wurde das gleiche Gemisch der Säurehydrolyse, der Entzuckerung und Enteiweissung unterworfen, worauf wieder photometriert wurde. Erwartungsgemäss ergab sich ein viel zu hoher Milchsäurewert (0,184 %

<sup>1)</sup> *S. B. Barker*, Am. J. Physiology 129 P, 305 (1940).

<sup>2)</sup> *R. Möhlau* und *M. Heinze*, B. 35, 361 (1902).

statt 0,111%). Schliesslich wurde die hydrolysierte, entzuckerte und enteiweisste Lösung noch mit Natriumamalgam hydriert. Nach dieser Vorbehandlung ergab die Guajakolmethode 0,123% Milchsäure. Der Wert war somit noch um 11% zu hoch. Immerhin hatte die Hydrierung der Brenztraubensäure zu Milchsäure bewirkt, dass die Abweichung von der ursprünglich vorgelegten Milchsäuremenge bedeutend verkleinert wurde.

### Experimenteller Teil.

#### Säurehydrolyse und Entzuckerung.

Reagenzien: Schwefelsäurelösung, 10-proz.

Natronlauge, konz., ca. 43-proz.

Kupfersulfatlösung, 10-proz. (100 g CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O im Liter).

Kalkmilch, 10-proz. (100 g CaO, rein, pulverisiert in 1 Liter Wasser aufgeschwemmt).

Je nach Milchsäurekonzentration der zu untersuchenden Flüssigkeit pipettiere man in der Regel 10,0 bis 60,0 cm<sup>3</sup> in einen Messkolben von 100,0 cm<sup>3</sup> Inhalt. Man setze dem Kolbeninhalt 1,0 cm<sup>3</sup> 10-proz. Schwefelsäure zu und erwärme im Wasserbad etwa 15 Minuten lang.

Der auf Zimmertemperatur abgekühlten Lösung werden 12 cm<sup>3</sup> Kupfersulfatlösung zugesetzt, worauf mit einigen Tropfen starker Natronlauge gegen Lackmuspapier neutralisiert wird. Nach Zugabe von 20 cm<sup>3</sup> Kalkmilch wird bis zur Marke aufgefüllt, 4 Stunden stehen gelassen und hierauf durch einen gewöhnlichen Rundfilter abfiltriert.

Bei kleineren Flüssigkeitsmengen kann man die Hydrolyse und die Entzuckerung mit entsprechend reduzierten Reagenzmengen ausführen.

Enthält die zu untersuchende Flüssigkeit neben viel fällbarem Protein nur wenig Milchsäure (z. B. Blut oder Milch), so muss vor der Entzuckerung eine erste Enteiweißung durchgeführt werden. In solchen Fällen reicht die Empfindlichkeit der hier beschriebenen Guajakolmethode nicht aus, zumal grössere Proteinkörper ohne wesentliche Verdünnungen nicht entfernt werden können. Man bedient sich dann besser der Vorschriften, die von Mendel<sup>1)</sup><sup>2)</sup> für die kolorimetrische Bestimmung mit Veratrol oder die von Lehnartz<sup>3)</sup> für die Bestimmungsmethode mit Kaliumpermanganat angegeben wurden. Noch besser dürfte sich die neuerdings beschriebene p-Oxydiphenylmethode, mit ihrer hohen Empfindlichkeit eignen<sup>4)</sup><sup>5)</sup>.

#### Enteiweißung von bereits entzuckerten Filtraten mit Hilfe einer Kationenaustauscherkolonne aus Kunstharz.

Etwa 30 g Kationenaustauscherkunstharz werden in einem Porzellanmörser mässig zerkleinert. Durch anschliessendes 8-stündiges Ausschwemmen mit Leitungswasser wird das feinkörnige Material von zu feinen Partikelchen befreit. Zurückbleiben sollten vorzugsweise Körnchen von etwa 20 μ Durchmesser. Mit diesem Harzmaterial fülle man ein Glasrohr mit unten angesetztem Hahn bis zur Hälfte. Die Grösse des Glasrohres sollte etwa 2 cm im Durchmesser und 15 cm in der Länge betragen. Ein Wattenpropf, oberhalb des Hahnes angebracht, verhindert das Durchlaufen von Filtermaterial.

Nun wird die Harzkolonne durch Aufgiessen von ca. 40 cm<sup>3</sup> 10-proz. Salzsäure und durch 4-5-maliges Durchspülen mit destilliertem Wasser neutralgewaschen (Lackmus) und aktiviert.

<sup>1)</sup> B. Mendel und I. Goldscheider, Bioch. Z. 164, 164 (1925).

<sup>2)</sup> B. Mendel, Bioch. Z. 202, 390 (1928).

<sup>3)</sup> E. Lehnartz, Z. physiol. Ch. 179, 1 (1928).

<sup>4)</sup> R. H. Koenemann, J. Biol. Chem. 135, 105 (1940).

<sup>5)</sup> S. B. Barker und W. H. Summerson, J. Biol. Chem. 138, 535 (1941).

Die Austauschfähigkeit von  $1 \text{ cm}^3$  Harz beträgt etwa 3 Millimole Kation. Eine ähnliche Kolonne, wie die oben erläuterte, hat Hadorn<sup>1)</sup> beschrieben.

Die so aktivierte Kolonne wird nun zweimal mit ca.  $10 \text{ cm}^3$  des entzuckerten Filtrates durchgespült. Das Filtrat der dritten und eventuell nachfolgenden Portionen kann alsdann zur quantitativen Analyse verwendet werden.

### Regenerierung und Reinigung der Harzkolonne.

Die Harzkolonne von den oben angegebenen Dimensionen vermag praktisch zwei entzuckerte Proben vollständig zu entkationisieren. Es ist daher empfehlenswert, nach jeder zweiten Probe die Regenerierung mit etwa  $40 \text{ cm}^3$  10-proz. Salzsäure und durch anschliessendes Spülen mit destilliertem Wasser vorzunehmen.

Das Filtrat einer durch den Kationenaustauscher laufenden, vorher entzuckerten Probe, erscheint normalerweise vollständig farblos und wasserklar; trifft dies nicht einwandfrei zu, so ist die Kolonne gründlich zu reinigen. Bei öfterem Gebrauch ist eine Verschmutzung der Harzkolonne durch organische Stoffe (Aminosäuren usw.) unvermeidlich. Es ist daher ratsam, den Inhalt der Kolonne allmonatlich in einem Becherglas 2-3 mal hintereinander mit kalter, verdünnter Natronlauge zu behandeln und anschliessend mit Salzsäure zu regenerieren. Auf diese Art bleibt das gleiche Harzmaterial mit unveränderter Wirksamkeit beliebig lange verwendbar.

### Die Hydrierung des entzuckerten und enteiweissten Filtrates mit Natriumamalgam.

Zu 100 g gereinigtem und destilliertem Quecksilber füge man in kleineren Portionen 4 g geschältes und trockenes Natriummetall. Zweckmässig verreibe man das Natrium portionsweise in einem kleinen Porzellanmörser, wobei eine am Pistill angebrachte durchbohrte Kartonplatte die Hand schützt. Beim Verreiben löst sich das Natrium zunächst unter Feuererscheinung auf; gegen Ende kann die Natriumzugabe in grösseren Portionen erfolgen. Man trachte danach, das noch heisse Gemisch möglichst homogen zu zerdrücken. Vor Luftfeuchtigkeit geschützt, kann es beliebig lang aufbewahrt werden.

Man pipettiere  $5,0 \text{ cm}^3$  des Filtrates aus der Harzkolonne in ein gewöhnliches Reagenzglas. Zur Korrektur des Endvolumens fügt man  $0,35 \text{ cm}^3$  destilliertes Wasser hinzu ( $0,07 \text{ cm}^3$  pro Gramm verwendetes Amalgam) und notiert den Meniskus mit einem Diamantstift. Nun setzt man 5 g Natriumamalgam zu und stellt das Reagenzglas in ein Wasserbad (Becherglas) bis zum Aufhören der Wasserstoffentwicklung. Meistens ist die Reaktion nach 20 Minuten beendet. Nach dem Abkühlen füllt man wieder bis zur Marke auf und filtriert durch einen Rundfilter vom metallischen Quecksilber in ein sauberes und trockenes Reagenzglas ab.  $0,5 \text{ cm}^3$  des so gewonnenen Filtrates dient dann zur stufenphotometrischen Bestimmung der Milchsäure (vgl. I. Teil).

### Prüfung auf Vollständigkeit der Entzuckerung und Enteiweissung.

Versuche mit Zuckern. Es wurden 2%ige wässrige Lösungen verwendet, wobei u. a. geprüft wurde: D-Fructose, D-Glucose, Maltose, Saccharose.

In einen  $100,0 \text{ cm}^3$  Messkolben wurden  $25,0 \text{ cm}^3$  einer 0,4-proz. Milchsäurelösung,  $10,0 \text{ cm}^3$  einer der angeführten Zuckerlösungen und  $15 \text{ cm}^3$  destilliertes Wasser pipettiert. Je nach dem, ob der zugesetzte Zucker eine freie oxydierende Gruppe enthält oder nicht, musste zunächst eine Säurehydrolyse mit  $1,0 \text{ cm}^3$  10-proz. Schwefelsäure bei anschliessender Neutralisation mit starker Natronlauge vorgenommen werden. Hierauf wurden  $12 \text{ cm}^3$  10-proz. Kupfersulfatlösung und  $20 \text{ cm}^3$  Kalkmilch (10-proz.) zugesetzt. Als dann erfolgte Auffüllen bis zur Marke. Die Endkonzentrationen betrugen somit 0,1% für die Milchsäure und 0,2% für den Zucker. Nach 4-stündigem Stehenlassen wurde abfiltriert und das Filtrat durch die Kationenaustauscherkolonne geschickt. Das dritte Filtrat diente dann zur stufenphotometrischen Milchsäurebestimmung. Gefunden wurde genau die vorgelegte Milchsäuremenge, nämlich 0,10%.

<sup>1)</sup> H. Hadorn, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. 37, 114 (1946).

Die erhaltenen Resultate zeigten in allen Fällen, dass die geprüften Zucker mit Ausnahme eines einzigen, quantitativ eliminierbar waren. Diese Ausnahme bildete die L-Rhamnose (Methylpentose), welche, trotz wiederholter Behandlung, nicht restlos entfernt werden konnte.

**Versuche mit Aminosäuren und Eiweissabbauprodukten.** Es wurden folgende wässrige Lösungen geprüft: Glykokoll, 2-proz., L-Leucin, 2-proz., Cystein, 0,01-proz., Glutathion, 0,02-proz.

Ferner wurden 0,2 g Casein + 0,2 g Lactalbumin unter Zugabe von 96 cm<sup>3</sup> Wasser, 4 cm<sup>3</sup> Salzsäure (25-proz.) und 1 g Pepsin während 48 Stunden bei 37° (Brutschrank) abgebaut. Den gleichen Abbau erfuhren auch 0,4 g Trockenvolleipulver.

Zu 25,0 cm<sup>3</sup> einer 0,4-proz. Milchsäurelösung wurden 10 cm<sup>3</sup> der obigen Eiweiss- bzw. Aminosäurelösungen zugesetzt, worauf die vorbeschriebene Behandlung mit Kupfer-Kalk und mit der Kationenaustauscherkolonne zur Ausführung gelangte. Die stufenphotometrische Bestimmung ergab in allen Fällen genau die vorgelegte Milchsäuremenge von 0,10%.

Es ist hier zu bemerken, dass die Eiweisslösungen bzw. Aminosäuren, direkt mit Guajakol entwickelt, eine bedeutende Extinktion verursachen.

Eine qualitative Prüfung zeigte, dass enteiweisste Lösungen weder die Biuret-, noch die Ninhydrinreaktion mehr zeigten. Angesichts der hohen Empfindlichkeit des letzteren Reagens auf α-Aminosäuren<sup>1)</sup> darf man annehmen, dass in den untersuchten Fällen eine spurlose Entfernung der Aminosäuren bzw. Eiweissabbauprodukte stattgefunden hatte.

Wie zu erwarten war, vermochte der gleichzeitige Zusatz von Zuckern und Eiweisslösungen die Milchsäureanalysenwerte nicht zu beeinflussen. Es wurde u. a. folgende Prüfung vorgenommen:

In einem 100,0 cm<sup>3</sup> Messkolben wurden 40,0 cm<sup>3</sup> einer 0,4-proz. Milchsäurelösung mit 10 cm<sup>3</sup> Saccharoselösung (2-proz.) und 10 cm<sup>3</sup> Trockenvolleidepolymerisat (0,4-proz.) versetzt und auf dem üblichen Wege entzuckert und enteiwesst. Gefunden wurden 0,165% Milchsäure, statt der vorgelegten 0,160%, eine Abweichung, welche noch innerhalb des Bereiches des mittleren für reine Milchsäurelösungen bestimmten Messfehlers liegt (vgl. I. Teil).

#### Milchsäurebestimmung in Gegenwart von Aldehyden.

25,0 cm<sup>3</sup> einer 0,4-proz. Milchsäurelösung + 10 cm<sup>3</sup> einer 2-proz. Formaldehydlösung (entsprechend 0,1% Milchsäure neben 0,2% Formaldehyd im 100,0 cm<sup>3</sup> Messkolben) ergeben nach Hydrolyse, Entzuckerung, Enteiweißung und Hydrierung mit Natriumamalgam statt der ursprünglich vorgelegten 0,100%, 0,102% Milchsäure, eine Übereinstimmung, die als gut bezeichnet werden kann.

Trotz wiederholter Bemühungen gelang es uns leider nicht, den störenden Einfluss des Acetaldehyds oder der L-Rhamnose restlos zu eliminieren. Dass das nächsthöhere Homologe der Milchsäure (α-Oxypropionsäure), die α-Oxybuttersäure, sich auf diesem Wege nicht entfernen liess, war theoretisch zu erwarten. Es mag interessant sein, dass sich die Glykolsäure (Oxyessigsäure) und der Formaldehyd im Gegensatz zur Milchsäure, sowie α-Oxybuttersäure bzw. zum Acetaldehyd vollständig entfernen liessen. Auch hier zeigt sich wieder einmal deutlich die besondere Stellung, welche die ersten Glieder einer homologen Reihe einnehmen.

#### Milchsäurebestimmung in Gegenwart von Brenztraubensäure.

Brenztraubensäure gibt mit Guajakol eine sehr intensive, gelbrote Färbung, welche im Stufenphotometer, mit dem Blauviolettfilter (S 43) gemessen, eine sehr starke Extinktion hervorruft und eine der intensivsten Störkomponenten darstellt.

<sup>1)</sup> E. Abderhalden und H. Schmidt, Z. physiol. Ch. 85, 143 (1913).

Zur Prüfung der Störwirkung wurden  $27,5 \text{ cm}^3$  einer 0,4-proz. Milchsäurelösung abpipettiert. Nach Verdünnung auf  $100,0 \text{ cm}^3$  liess sich im Stufenphotometer eine Milchsäurekonzentration von 0,111% ermitteln. Als Zusatz dienten  $5,0 \text{ cm}^3$  einer 2-proz. Brenztraubensäurelösung, so dass letztere im Gemisch in etwa 0,1-proz. Stärke gegen war. Das Ergebnis der Prüfung haben wir im letzten Absatz des theoretischen Teils beschrieben.

### Zusammenfassung.

Unter Hinweis auf die Permanganatmethode von *Fürth-Charnass* und unter Hinweis auf das Destillationsverfahren von *Lepper* wurde, ausgehend von der von *Denigès* beschriebenen Farbreaktion mit Guajakol, eine neue Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der Milchsäure mit Hilfe des Stufenphotometers beschrieben. Die Spezifität der Farbreaktion mit Guajakol wurde einer besonderen Prüfung unterzogen. Die Körper, welche mit Guajakol ebenfalls eine mehr oder weniger ausgeprägte, die kolorimetrische Milchsäurebestimmung störende Farbreaktion geben, sind in einer Tabelle gruppenweise zusammengestellt (vgl. die Spalten 1 und 2).

Zwecks Entfernung verschiedener Störsubstanzen wurde eine neue Enteiweißungsmethode mit Hilfe einer Kationenaustauscher-eigenschaften besitzenden Kunstharzkolonne vorgeschlagen. Diese Methode lässt neben Eiweißstoffen auch polymere Eiweißabbauprodukte und Aminosäuren restlos eliminieren. Bei der kolorimetrischen Milchsäurebestimmung in biologischen Flüssigkeiten wird sie zwecks Ausschaltung sämtlicher Kohlehydrate mit einer vorausgehenden Hydrolyse sowie mit der bekannten Kupfer-Kalkfällung kombiniert.

Eine Anzahl Versuche zeigten, dass eine der Entzuckerung folgende milde Hydrierung mit Natrium amalgam in wässriger Lösung das Ergebnis der quantitativen kolorimetrischen Milchsäurebestimmung wesentlich zu verbessern vermag.

Die beschriebene Methode der quantitativen kolorimetrischen Milchsäurebestimmung stellt noch keine endgültig befriedigende Lösung dar. Sie ist vielmehr als ein Schritt zur Vervollkommenung der bisher bekannten Methoden zu betrachten.

Zahlreiche Analysen biologischer Flüssigkeiten (Gärfutter-extrakte) zeigten uns, dass sich zwischen dem hier entwickelten kolorimetrischen Verfahren und der Permanganatmethode von *Fürth-Charnass* in vielen Fällen eine ausgezeichnete, in anderen wenigstens eine annähernde Übereinstimmung erzielen lässt. Ergänzend sei bemerkt, dass unsere, auf die Guajakolmethode Bezug nehmende Erfahrung weitgehend auch auf die in der neueren Literatur öfters beschriebene kolorimetrische Milchsäurebestimmung mit p-Oxydiphenyl anwendbar sein dürfte.

Schliesslich sei erwähnt, dass die beschriebene Vorbehandlung biologischer Flüssigkeiten dank der wasserklaren Filtrate, die sie gibt, ausser bei der Bestimmung der Milchsäure auch bei der Kolorimetrie anderer Körper von Nutzen sein kann, vorausgesetzt, dass sich die betreffenden Körper gegenüber der vorgeschlagenen Vorbehandlung als neutral erweisen.

Herrn Professor Dr. *E. Crasemann*, Vorstand des Institutes für Haustierernährung, der Eidg. Technischen Hochschule, sei an dieser Stelle für das stete Interesse, welches er für die vorliegende Arbeit bekundet hat, bestens gedankt.

Laboratorium des Institutes für Haustierernährung,  
Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich.

---

**121. Synthèse d'époxydes hydro-aromatiques I<sup>1)</sup>.  
( $\alpha$ -Tétrahydro-furyl-méthyl)-2[4]-tétrahydro-ionène-2[2?]**

par **M. Stoll et A. Rouvé.**

(19 III 48)

Tandis que les groupes fonctionnels aldéhydiques, cétoniques, lactoniques, etc. sont bien connus comme osmophores, le groupe époxydique est resté passablement ignoré. D'une part, le nombre des époxydes hydro-aromatiques trouvés dans la nature est extrêmement petit. D'autre part, leur odeur s'est presque toujours révélée camphrée. On avait donc l'impression que le groupe époxydique ne possédait pas les qualités essentielles d'un osmophage véritable.

L'odeur musquée de l'époxy-1,15-pentadécaméthylène<sup>2)</sup>, quoique faible, nous avait cependant révélé que les époxydes macrocycliques peuvent avoir des odeurs intéressantes. Elle nous avait en outre convaincus que la structure du reste détermine le genre de l'odeur.

Il nous a donc semblé intéressant de préparer un certain nombre d'époxydes hydro-aromatiques dont le reste hydrocarbonique appartiendrait à une classe importante de substances odorantes, celle des ionones, par exemple.

Nous avons choisi la constitution du premier représentant de cette série en partant de l'hypothèse que l'odeur faible mais intéressante du scalaréol<sup>3)</sup> pouvait provenir de traces d'un époxyde ayant une structure voisine de celle du scalaréol, soit environ 18 à 20 atomes de carbone dans la molécule.

<sup>1)</sup> Ce travail a été exécuté en 1937.

<sup>2)</sup> *Stoll et Scherrer*, Helv. **19**, 735 (1936).

<sup>3)</sup> *L. Ruzicka et J. Janot*, Helv. **14**, 647 (1931).