

Das antiskorbutische Vitamin.

Von

Prof. Dr. J. Tillmans.

Mitteilung aus dem Universitäts-Institut für Nahrungsmittelchemie in
Frankfurt a. M.

In meinem heutigen Vortrage möchte ich Ihnen einen zusammenfassenden Bericht geben über Forschungen, welche ich in den letzten Jahren in Gemeinschaft mit meinem Mitarbeiter Herrn Dr. Paul Hirsch, ferner mit den Herren Doktoranden Karl Trillhose, Walter Hirsch und Friedrich Siebert ausgeführt habe. Die Arbeiten der beiden zuletzt genannten Herren sind noch nicht abgeschlossen.

Auf der Jahresversammlung des Vereins in Nürnberg im Jahre 1927 hatte ich die Ehre, vor Ihnen zu sprechen über die Bestimmung der Reduktions-Oxydations-Potentiale und ihre Anwendung in der Lebensmittelchemie. Die Arbeiten entstanden aus dem Gedanken, daß zwei Reaktionen einer biologischen Flüssigkeit — viele Lebensmittel sind ja biologische Flüssigkeiten — einen besonderen Charakter aufprägen müssen. Die erste Reaktion ist die acidimetrische Reaktion, welche ihren quantitativen Ausdruck in der Wasserstoffionenkonzentration findet. Vielleicht in noch höherem Maße als diese Reaktion ist aber die Reduktions-Oxydations-Reaktion geeignet, einer biologischen Flüssigkeit ein besonderes Gepräge zu verleihen, d. h. je nachdem die Flüssigkeit ein mehr oder wenig starkes oder schwaches Reduktions- oder Oxydationsmittel ist, muß sie besondere Eigenschaften zeigen. Die Stärke eines Reduktions-Oxydationsmittels wird quantitativ am Reduktions-Oxydations-Potential gemessen, wie ich in Nürnberg näher erläutert habe. Das Studium der Literatur zeigte uns nun, daß Reduktions-Oxydations-Potentiale in der Biochemie vereinzelt, in der Nahrungsmittelchemie dagegen nicht gemessen worden waren. Die Ursache hierfür war unschwer darin zu finden, daß es eben an einer einfachen Meßmethode fehlt. Für die Messung der Wasserstoffionenkonzentration gibt es die einfache Indicatorenmethode. Diese Methode war es wohl, welche der Wasserstoffionenkonzentration zu ihrem schnellen Siegeszuge über alle Gebiete der Naturwissenschaft verholfen hat. Ein ähnliches Verfahren müßte aber auch für die Reduktions-Oxydations-Potentiale zu schaffen sein. Es gibt Farbstoffe, welche sich durch Reduktion entfärben und durch Oxydation wieder färben. Der bekannteste Typ dieser Farbstoffe ist das Methylenblau. Wenn man über genügende Farbstoffe verschiedenen Normalpotentials verfügen würde, so könnte man auch die Reduktions-Oxydations-Potentiale, reversible Systeme vorausgesetzt, colorimetrisch bestimmen. Über diese Frage ist eine Arbeit in meinem Institut von Hirsch und Rüter¹⁾ ausgeführt worden. Es wurde am Beispiel des Methylenblaus durch theoretische Erwägungen und praktische Versuche gezeigt, daß in der Tat das Potential auf diesem Wege bestimmbar ist. Einen kurzen Auszug aus der Arbeit habe ich in Nürnberg vorgetragen. Wir stellten nun nach Fertigstellung unserer Arbeit fest, daß ein amerikanischer Forscher, Prof. Mansfield W. Clark, der Direktor der Hygienischen Abteilung des Staatl. Gesundheitsamtes in Washington, dasselbe Ziel mit ähnlichen Gedankengängen verfolgt hatte. Die Arbeiten Clark's waren damals in der deutschen Literatur noch nicht beachtet worden. Herr Prof. Clark sandte mir auf meine Bitte

¹⁾ Zeitschr. analyt. Chem. 1926, **68**, 328; 1926, **69**, 193. — Siehe auch Rudolf Rüter, Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1926.

Sonderabdrucke seiner Arbeiten zu, aus denen wir ersahen, daß er in der Verfolgung dieses Zieles schon wesentlich weiter gekommen war als wir. Es hatte deshalb für uns keinen Zweck mehr, die ursprüngliche Idee weiter zu verfolgen, die übrigens mittlerweile in weiteren hoch interessanten und sehr wertvollen Arbeiten von Clark so gut wie verwirklicht worden ist. Wir haben deshalb lieber festgestellt, was mit den mittlerweile von Clark geschaffenen und auf ihr Normalpotential gemessenen Indikatoren für die Zwecke der Lebensmittelchemie anzufangen sei. Eine von Clark gemessene Farbstoffgruppe, das Phenolindophenol und verschiedene seiner Abkömmlinge erweckten hierfür unser besonderes Interesse. Ganz besonders haben wir uns beschäftigt mit dem 2,6-Dichlorphenolindophenol. Das Normalpotential dieser Farbstoffe liegt so positiv, daß sie schon durch schwache Reduktionsmittel entfärbt werden müssen. Sie müssen schon völlig entfärbt sein bei Vorhandensein von Reduktionskräften, welche das Methylenblau noch unentfärbt lassen. In Lebensmitteln sind aber im allgemeinen nur schwache Reduktions- oder Oxydationskräfte zu erwarten, in ähnlicher Weise wie auch eine stark alkalische oder stark saure Reaktion in Lebensmitteln im allgemeinen nicht vorkommt, sondern die Reaktion der biologischen Flüssigkeiten sich meist in der Nähe des Neutralpunktes bewegt. Ich habe deshalb zusammen mit Hirsch und Reinshagen¹⁾ verschiedene Lebensmittel mit dem Farbstoff 2,6-Dichlorphenolindophenol geprüft. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, daß in Citronen- und Apfelsinensäften in beträchtlichen Mengen ein reduzierender Körper vorhanden ist, durch dessen Nachweis man Kunstsäfte und frische Natursäfte ohne weiteres zu unterscheiden vermag. In Nürnberg habe ich schon die Titration von Kunst- und Naturcitronensaft mit einer 2,6-Dichlorphenolindophenolfarbstofflösung vorgeführt. Diese Titration will ich heute nochmals zeigen und zwar deswegen, weil ich in meinen weiteren Ausführungen immer darauf zurückkommen muß. Bei den später zu beschreibenden Untersuchungen über diesen reduzierenden Körper ist die Titration mit dem Farbstoff immer unser Mittel, festzustellen, ob der reduzierende Körper vorhanden ist oder nicht, in welcher Menge er vorhanden ist und ob seine Menge sich durch irgendeine Behandlung verändert hat.

Man löst in einer bestimmten Menge Citronensaft festes Natriumacetat auf. Dadurch wird die Wasserstoffionenkonzentration der Flüssigkeit so weit dem Neutralpunkt angenähert, wie es für die Titration mit dem Farbstoff erforderlich ist. Man läßt nun aus einer Bürette so viel einer 0,001 N.-Farbstofflösung zufließen, bis eben eine Blaufärbung dauernd bestehen bleibt.

Citronen und Apfelsinen enthalten bekanntlich viel antiskorbutisches Vitamin. Wir kamen deswegen sofort auf den Gedanken, ob dieser unbekannte reduzierende Körper nicht möglicherweise mit dem antiskorbutischen Vitamin in Beziehungen stände oder gar mit ihm identisch sei. Wie nahe dieser Gedanke lag, ist daraus zu ersehen, daß in der Diskussion zu meinem Nürnberger Vortrage Herr Kollege Borinski-Berlin an mich die Frage richtete, ob dieser Körper vielleicht mit dem C-Vitamin etwas zu tun habe. Da unsere Arbeiten über diese Frage noch nicht so weit gediehen waren, daß ich eine endgültige Auskunft auf die Frage geben konnte, so habe ich die Frage zwar soweit als damals möglich beantwortet, aber aus naheliegenden Gründen gebeten, die Frage des Herrn Borinski sowohl wie meine Antwort nicht in das Protokoll aufzunehmen, was auch geschehen ist. Mittlerweile ist nun die Frage von uns ausführlich studiert worden, und hierauf sollen sich meine folgenden Ausführungen beziehen.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1928, 56, 272.

I. Prüfung der Eigenschaften.

Wir haben nun zunächst die aus der Literatur bekannten Eigenschaften des C-Vitamins mit den Eigenschaften des reduzierenden Körpers verglichen. Vom Vitamin ist bekannt, daß es in Wasser und Alkohol löslich, dagegen unlöslich in anderen Lösungsmitteln wie Benzin, Benzol, Äther, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff usw. ist. Der unbekannte reduzierende Körper ist löslich in Wasser, Alkohol und Aceton, dagegen ebenfalls unlöslich in allen übrigen Lösungsmitteln. Über die Löslichkeit des C-Vitamins in Aceton geben die meisten Forscher nichts an, vermutlich deswegen, weil dieses Lösungsmittel nicht geprüft worden ist. Daß das C-Vitamin in der Tat in Aceton löslich sein muß, ergibt sich mit voller Sicherheit aus den von uns ausgeführten Tierversuchen, welche noch beschrieben werden. Im übrigen wird auch in den später noch zu erwähnenden Arbeiten von Bezssonoff und Agopian angegeben, daß das C-Vitamin in Aceton löslich sei. Die Löslichkeitsverhältnisse von C-Vitamin und dem unbekanntem reduzierenden Körper sind also dieselben.

Das C-Vitamin ist gegen Erhitzen empfindlich. Dabei ist sehr bemerkenswert, daß längeres Erhitzen auf niedrigere Temperaturen mehr schadet als kurzes Kochen. Wir führten mit frisch ausgepreßtem Citronensaft folgende Versuche aus: Er wurde sofort titriert, ferner nachdem kurze Zeit im Erlenmeyer-Kolben aufgeköcht worden war und endlich nachdem eine Stunde lang auf 63 bis 67° erhitzt worden war. Die die dabei erhaltenen Titrationswerte sind folgende:

5 ccm Saft	Titrationwert ccm 0,001 n	Verlust ccm 0,001 n
Sofort	34,6	—
Nach kurzem Aufkochen im Erlenmeyer-Kolben	32,2	2,4
1 Stunde auf 63—67° erhitzt	24,5	10,1

Auch der unbekannte Körper wird also durch Erhitzen beeinflusst, und zwar durch kurzes Kochen weniger als durch längeres Erhitzen auf niedrigere Temperaturen.

Das C-Vitamin wird durch Sauerstoff stark geschädigt, durch längere Einwirkung von Sauerstoff wird es unwirksam. Wir führten folgende Versuche mit Citronensaft aus: Es wurde durch frisch ausgepreßten Citronensaft längere Zeit Sauerstoff, Luft und Stickstoff hindurchgeleitet und dann in je 5 ccm Citronensaft sofort nach dem Auspressen und nach verschiedenen Zeiten des Durchleitens der Gase der Titrationswert mit Farbstoff bestimmt. Aus den Ergebnissen seien folgende Zahlen mitgeteilt:

Zeit	Titrationwert (ccm 0,001 n) für je 5 ccm Saft nach Durchleiten von		
	Sauerstoff	Luft	Stickstoff
Sofort	44	44	44
Nach 1 Tag	2	34	42
Nach 2 Tagen	1,5	23	41,5

Die Versuche zeigen, daß Sauerstoff die reduzierende Kraft sehr stark zerstört, Luft ebenfalls stark, aber weniger stark als Sauerstoff und Stickstoff praktisch nicht. Die kleinen Abnahmen, welche hier gefunden sind, sind wohl darauf zurückzuführen, daß es nicht völlig gelungen ist, den Sauerstoff auszuschließen.

Das C-Vitamin ist gegen verdünnte Säuren wenig empfindlich. Wir gaben zu Citronensaft so viel N.-Salzsäure zu, daß die ganze Flüssigkeit 0,1-normal an Salzsäure

war und titrierten dann wieder je 5 ccm des Saftes sofort und nach verschiedenen Zeiten. Dabei wurde folgendes für 5 ccm Saft gefunden:

Sofort	39,0 ccm 0,001 n
Nach 2 Stunden	39,0 " "
Nach 1 Tag	27,6 " "

Hierbei sei bemerkt, daß die Aufbewahrung an der Luft erfolgte. Die Abnahme ist also, wenigstens zum Teil, auf die Wirkung des Sauerstoffs zurückzuführen.

Durch dünnes Alkali wird das antiskorbutische Vitamin schnell unwirksam. Es ist außerordentlich empfindlich gegen Alkali. Wir neutralisierten größere Mengen Citronensaft und gaben dann so viel Alkali hinzu, daß die ganze Flüssigkeit eine 0,1 N.-Alkalilösung war. Die Aufbewahrung geschah wieder an der Luft. Nun wurden je 5 ccm wieder sofort und nach verschiedenen Zeiten der Aufbewahrung der Titration mit dem Farbstoff unterworfen. Dabei ergab sich folgendes für 5 g Saft:

Sofort	39,0 ccm 0,001 n
Nach 2 Stunden	24,8 " "
Nach 1 Tag	0 " "

Aus diesen Resultaten ergibt sich also eine ganz verblüffende Übereinstimmung der Eigenschaften des unbekanntem reduzierenden Körpers mit denen des antiskorbutischen Vitamins.

II. Feststellung des Gehaltes verschiedener Lebensmittel an reduzierendem Stoff.

Der zweite Weg, den wir zur Prüfung der genannten Frage einschlugen, bestand nun darin, daß wir aus den verschiedensten pflanzlichen Nahrungsmitteln Auszüge herstellten, sie mit dem Farbstoff titrierten und nun die erhaltenen Werte mit den Angaben der Literatur über den Gehalt an C-Vitamin verglichen. Zunächst wurde in der Weise gearbeitet, daß die zu untersuchenden Pflanzen zerkleinert und dann ausgepreßt wurden. Wir haben aber später gesehen, daß es durch dieses Auspressen nicht gelingt, den Gehalt an reduzierendem Körper völlig zu gewinnen. Es ist vielmehr nur etwa 30—50% des gesamten reduzierenden Körpers, der in der betreffenden Pflanzenmenge vorhanden ist, zu erhalten. Herr Siebert hat deswegen bei den späteren Untersuchungen die Auszüge so hergestellt, daß er die zerkleinerten Pflanzenteile unter Stickstoff — um die Sauerstoffwirkungen auszuschließen — mit Schwefelsäure in der Kälte stehen ließ bzw. unter Durchleiten von Stickstoff mit Schwefelsäure aufkochte. Die Prüfungen der Rückstände zeigten dann, daß nur noch spurenweise reduzierender Körper in ihnen zurückgeblieben war. Die Lösungen wurden durchgeseiht, der größte Teil der Schwefelsäure mit Natronlauge abgestumpft und dann der Rest der Schwefelsäure mit festem Natriumacetat weggenommen.

Die Titrationszahlen beziehen sich immer auf 10 g Substanz. Es wurden größere Mengen Substanz in Arbeit genommen, die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und nun ein aliquoter Teil, entsprechend 10 g Substanz, in der angegebenen Weise neutralisiert und titriert.

Die untersuchten Lebensmittel teile ich in drei Gruppen ein:

Erste Gruppe solche, die nach der Literatur viel C-Vitamin enthalten sollen oder wenigstens gut im Gehalte daran sind,

Zweite Gruppe solche, welche wenig oder genügend Vitamin C enthalten sollen, und

Dritte Gruppe solche Lebensmittel, welche sehr wenig C-Vitamin oder direkt nichts davon enthalten sollen.

In den nachstehenden Tabellen finden sich die Ergebnisse der Untersuchungen. Wenn die Zahlen mit * versehen sind, so heißt das, daß diese Zahlen an Pflanzenauspressungen gewonnen wurden. Die Zahlen werden sich vermutlich mindestens verdoppeln, wenn der Auszug mit Schwefelsäure unter Stickstoff bereitet werden würde.

Art des Lebensmittels	C-Gehalt nach der Literatur	Titrationwert ccm 0,001 n	Art des Lebensmittels	C-Gehalt nach der Literatur	Titrationwert ccm 0,001 n
Gruppe I. Viel C-Vitamin			Gruppe II. Wenig bis genügend C-Vitamin		
Citronen . . .	sehr viel	60—80	Kochäpfel . . .	gering	2—4
Orangen . . .	„ „	60—80	Möhren . . .	gut bis gering	5,5—9,5
Frisches Gras . . .	„ „	86	Milch . . .	wenig	1—2
Rotkraut . . .	sehr gut	48	Heidelbeeren . . .	gering	3*
Weißkraut . . .	„ „	50			
Kartoffeln . . .	„ „	20—30	Gruppe III. Sehr wenig oder kein C-Vitamin		
Grüner Salat . . .	„ „	15—34	Birnen . . .	sehr gering	0,5—1*
Bananen . . .	viel bis genügend	21	Pflaumen . . .	„ „	0,5—1*
Johannisbeeren	gut	15—20*	Pfirsiche . . .	„ „	1—2*
Erdbeeren . . .	„ „	20*	Hafer . . .	0	0
Blumenkohl . . .	sehr gut	25*	Pilze (Hut-) . . .	0	0
Tomaten . . .	„ „	15—20*			

Bei den Literaturangaben haben wir uns auf die Bücher von R. Berg und Scheunert gestützt. Wo die Angaben dieser Bücher abweichend waren, stimmten unsere Befunde immer besser mit Scheunert's Angaben überein.

Die Versuche zeigen, daß eine gewisse Parallelität im Gehalte an C-Vitamin und im Gehalte an reduzierendem Körper vorhanden ist, in dem Sinne, daß da, wo die Literatur viel C-Vitamin angibt, auch viel titriert wird; wo die Literatur nur wenig oder genügend C-Vitamin angibt, wird wenig titriert, und wo sie sehr wenig oder gar nichts angibt, wird auch sehr wenig reduzierender Körper oder gar keiner gefunden.

Man könnte nun den Einwand erheben, ob das, was hier reduziert, wirklich auch in allen Fällen unser reduzierender Körper ist. Könnten nicht in Lebensmitteln irgendwelche anderen bekannten reduzierenden Stoffe vorhanden sein oder bei der Herstellung der Auszüge aus den Hauptnährstoffen der Lebensmittel entstehen? Das ist nicht der Fall. Es handelt sich bei der Reduktionswirkung tatsächlich um die Wirkung eines besonderen neuen reduzierenden Körpers und zwar aus folgenden Gründen:

1. Die bekannten in Lebensmitteln vorkommenden Körper reduzieren den Farbstoff nicht, so alle Zucker in neutraler oder schwach saurer Lösung, Aldehyde wie Formaldehyd, Acetaldehyd, Furfurol, organische Säuren wie Ameisensäure, Weinsäure, Apfelsäure, Citronensäure, Milchsäure und Glycerin. Auch die bei der Destillation der Lebensmittel nach J. König¹⁾ erhaltenen flüchtigen Substanzen reduzieren den Indophenolfarbstoff nicht.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1929, 57, 377.

2. Wenn aus den sonstigen Nährstoffen wie Protein, Fett und Kohlenhydrat bei der Herstellung der Auszüge erst reduzierende Stoffe entstanden, so müßten, wenn man aus dem Rückstand ein zweites, ein drittes Mal usw. erneut Auszüge machte, immer neue Mengen reduzierenden Körpers, wenn auch wahrscheinlich in abnehmendem Maße, so doch bemerkbar, entstehen. Das ist aber nicht der Fall. Wenn der Rückstand ein zweites und drittes Mal verarbeitet wurde, so wurde immer nur noch spurenweise reduzierender Körper gefunden, Mengen, die sich ohne weiteres durch das nicht vorgenommene Auswaschen des Rückstandes erklären. Beim dritten Auszug war schon so gut wie nichts mehr vorhanden.

3. Es wäre auch ein großer und unmöglich anmutender Zufall, wenn diese aus anderen Stoffen bei der Herstellung der Auszüge etwa entstehenden reduzierenden Körper immer in ungefähr parallelen Mengen mit dem Gehalt der Lebensmittel an C-Vitamin entstehen würden.

III. Versuchte Reindarstellung des Körpers.

Auf die Reindarstellung des Körpers ist viel Mühe verwendet worden. Ich sehe davon ab, alle die Wege zu schildern, die sich als ungangbar erwiesen haben. Ich will nur den Weg angeben, nach dem jetzt gearbeitet wird, und muß sofort hinzufügen, daß die völlige Reindarstellung bisher nicht gelungen ist. Was die Reindarstellung in so hohem Maße erschwert, ist der Umstand, daß alle Operationen unter Stickstoff ausgeführt werden mußten. Arbeitet man bei Gegenwart von Luft, so erhält man so große Verluste, daß schließlich kein reduzierender Körper mehr übrig bleibt. Auch wo es im folgenden nicht besonders hervorgehoben ist, ist immer bei völligem Luftabschluß unter Stickstoff oder bisweilen auch Kohlensäure gearbeitet worden.

Der Gang der Reinigung war ungefähr folgender:

Man geht von möglichst viel Zitronensaft aus und säuert zur Zersetzung der Citrate mit etwas verdünnter Schwefelsäure an. Dann wird im schwachen Überschuß präcipitiertes Calciumcarbonat zugesetzt. Dadurch wird die Zitronensäure als Calciumcitrat gefällt. Man schleudert ab und säuert die abgeschleuderte Flüssigkeit schwach mit Phosphorsäure an. Dieser Zusatz hat den Sinn, die Luftempfindlichkeit abzuschwächen. Wie oben erläutert, ist der Körper luftempfindlich, aber in wesentlich geringerem Maße in saurer als in alkalischer oder neutraler Lösung. Dann wird im Vakuum auf etwa $\frac{1}{5}$ des Volumens unter gleichzeitigem Durchleiten von Stickstoff eingengt. Der konzentrierten Flüssigkeit wird noch etwas mehr Phosphorsäure zugefügt, bis die Flüssigkeit den Methylorangeumschlag zeigt. Man fällt dann auf das fünffache Volumen mit Aceton auf. Hierbei scheidet sich ein starker Niederschlag ab, der Salze, insbesondere Citrate und Phosphate, enthält; ferner scheiden sich Zucker und Pektin aus, während der reduzierende Körper größtenteils in Lösung verbleibt. Das Aceton wird nun im Vakuum weggedampft und diese Fällung mehrfach wiederholt. Die immer wieder ausfallenden Niederschläge werden durch Schleudern beseitigt. So erhält man eine Acetonlösung, bei der ungefähr 92 % der Trockensubstanz des Zitronensaftes ausgeschieden sind, wenn sie etwa ebenso konzentriert an reduzierendem Körper ist wie frischer Zitronensaft. Die Lösung ist unter Stickstoff im Eisschranke gut haltbar. Sie wurde vielfach von uns in dieser Weise auf Vorrat bereitet und aufgehoben.

Die Lösung wird nun in folgender Weise weiter gereinigt: Man setzt zunächst so viel Wasser zu, daß das Aceton ungefähr 10 % Wasser enthält. Nun wird neu-

tralisiert mit methylalkoholischer Barytlösung. Es fällt ein starker Niederschlag aus, welcher den ganzen reduzierenden Körper enthält. Dieser Niederschlag wird abgeschleudert und mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt, wobei man etwas mehr Schwefelsäure anwendet als Barium verwendet wurde. Vom ausgeschiedenen Bariumsulfat-Niederschlag wird abermals abgeschleudert. Zur abgeschleuderten Flüssigkeit, welche nun wieder den reduzierenden Körper enthält, gibt man Bleiacetat hinzu. Es entsteht ein starker Niederschlag, der ziemlich frei ist von reduzierendem Körper. Man schleudert wieder ab und entbleit die Lösung mit Schwefelwasserstoff. Die von Bleisulfid befreite Lösung wird im Vakuum konzentriert, wobei gleichzeitig der überschüssige Schwefelwasserstoff entfernt wird. Durch die Umsetzung des Bleiacetats ist Essigsäure in die Lösung gekommen, welche durch Extrahieren im Perforator mit Äther entfernt wird. Die ausgeätherte Lösung wird im Vakuum bis zum Sirup eingedampft. Den Sirup nimmt man mit Aceton auf. Die Acetonlösung wird durch Zusatz von Wasser und Wegdampfen des Acetons in wässrige Lösung übergeführt.

So wurden wässrige Lösungen erhalten, bei welchen, auf die gleiche Konzentration des reduzierenden Körpers wie im frischen Citronensaft bezogen, 97% der Trockensubstanz des Citronensaftes abgeschieden war. Das scheinbare Äquivalentgewicht dieser Lösung (mg Trockensubstanz für 1 ccm N.-Farbstofflösung) betrug 450—500. Da das scheinbare Äquivalentgewicht schon ziemlich klein war, haben wir versucht, den Körper nun aus Alkohol, Aceton und anderen Lösungsmitteln zum Krystallisieren zu bringen. Diese Versuche verliefen aber bisher völlig negativ. Es gelang nicht, einen krystallisierten reduzierenden Körper zu erhalten.

Wenn nun die Frage gestellt wird, was wir bisher Sicheres über die chemische Natur des Körpers wissen, so ist es verständlich, daß wir noch nicht sehr viel Sicheres darüber zu sagen wissen. Wir haben mit der näheren Untersuchung der Natur des Körpers auf die geglückte Reindarstellung gewartet. In diesem Falle wäre die chemische Natur natürlich viel schneller aufzuklären gewesen, als wenn, wie bisher, nur eine weitgehende Reinigung gelungen war, die aber neben dem Körper noch eine Reihe von anderen Stoffen zugegen ließ. Immerhin können wir auch heute schon einige Angaben machen: Zunächst steht fest, daß der Körper eine Säure ist und zwar eine Säure von etwa der Stärke der Essigsäure oder ähnlich starker organischer Carbonsäuren. Die wie oben geschildert gereinigte Lösung erwies sich als stickstoffhaltig und zwar wurden auf zwei Oxydationsäquivalente etwa ein Äquivalent Stickstoff gefunden. Ob der Körper selbst stickstoffhaltig ist oder ob es sich hier noch um stickstoffhaltige Verunreinigungen handelt, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Daß der Körper kein Fett oder Lipoid oder hochmolekulares Kohlenhydrat sein kann, folgt ohne weiteres aus den Löslichkeitsverhältnissen. Die Fehling'sche Lösung wird reduziert. Für die Anwesenheit von Zucker beweist das aber nichts; der Körper selbst reduziert ja und wird also auch die Fehling'sche Lösung reduzieren. Die Molisch'sche Reaktion auf Kohlenhydrate war positiv. Es befindet sich deshalb entweder noch Zucker als Verunreinigung in der Lösung, oder aber der Zucker ist ein Bestandteil des reduzierenden Körpers, was z. B. in Form eines Glykosids der Fall sein könnte. Die Gerbstoffreaktionen verliefen in den verwendeten Verdünnungen negativ. Die hervorstechendste Eigenschaft des Körpers ist sein typisches Reduktionsvermögen.

IV. Tierversuche.

Mit dem gereinigten Präparat, aus dem etwa 97% der Trockensubstanz des Citronensaftes ausgeschieden waren, wurden nun Tierversuche angestellt. Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen verwendet. Die Grundfütterung bestand aus Hafer, Heu und Milch, welche 1 Stunde auf 120° erhitzt worden war.

Beim ersten Tierversuch verwendeten wir drei Reihen von Tieren: Die erste Reihe erhielt nur diese Grundkost. Die zweite Reihe erhielt neben der Grundkost außerdem täglich je 1 ccm Citronensaft, der in neutralisierter Form aufgefüllt auf 2 ccm verabreicht wurde. Die dritte Reihe erhielt außer der Grundkost täglich dieselbe Menge an reduzierendem Stoff in ebenfalls 2 ccm des auf oben geschildertem Wege gereinigten Präparates. Bemerkenswert ist noch, daß während des Versuches, der natürlich mehrere Monate dauerte, der Reduktionswert des Präparates trotz aller Vorsicht zum Teil bis auf die Hälfte absank. In Reihe III ist also zeitweise nur die Hälfte des reduzierenden Körpers gefüttert worden wie bei der Reihe II, wo es sich immer um frischen Citronensaft handelte.

Das Resultat dieses Versuches war folgendes: Die Tiere der Reihe I zeigten bald große Gewichtsabnahmen; nach 3 Wochen waren sie alle skorbutkrank und starben kurz darauf. Die von einem sachverständigen Mediziner vorgenommene Sektion ließ alle Merkmale des Skorbutis deutlich erkennen. Die Tiere der Reihe II und III dagegen zeigten keine Gewichtsabnahme, vielmehr Gewichtszunahmen und blieben völlig gesund. Nur ein Tier der Reihe II (mit Citronensaft) starb schon bald. Die Sektion zeigte aber, daß es an einer Lungenerkrankung gestorben war, die mit Skorbut nichts zu tun hatte.

Ein zweiter Tierversuch wurde dann in der Weise ausgeführt, daß wieder drei Reihen von Tieren mit derselben Grundkost gefüttert wurden. Reihe I erhielt täglich 2 ccm des Präparates, Reihe II 1 ccm Citronensaft, bei dem aber der reduzierende Körper durch eine Menge Chlor in Form von Chlorwasser gerade oxydiert war und bei Reihe III erhielten die Tiere neben der Grundkost 2 ccm Präparat, bei dem der reduzierende Körper ebenfalls durch eine Zugabe von Chlor in Form von Chlorwasser gerade oxydiert war. Die Tiere der Reihe I erhielten ferner 3 Wochen lang neben dem unoxydierten auch das oxydierte Präparat. Diese Tiere der Reihe I blieben völlig gesund. Das bestätigt das Resultat des ersten Versuches, daß das unoxydierte Präparat antiskorbutisch hoch wirksam ist. Die Fütterung mit dem oxydierten Präparat daneben zeigt, daß dieses oxydierte Präparat an sich nicht giftig ist. Nach 5—6 Wochen waren alle mit oxydiertem Präparat und mit oxydiertem Citronensaft gefütterten Tiere skorbutkrank, wie wieder die medizinische Sektion der gestorbenen Tiere bewies.

Zusammenfassend läßt sich also über die Tierversuche sagen, daß das Präparat hoch wirksam ist, wenn es in der Menge des reduzierenden Körpers, wie er im frischen Citronensaft vorhanden ist, angewendet wird. Bei dem mit Chlorwasser oxydierten Präparat ist die antiskorbutische Wirkung vernichtet.

Man sollte nun glauben, daß man aus den bisherigen Resultaten wohl den Schluß herleiten könne, daß der reduzierende Körper und das antiskorbutische Vitamin identisch seien. Dieser Schluß wäre aber verfrüht.

V. Arbeiten anderer Forscher über dieses Gebiet.

Vor etwa 4—5 Wochen sind uns neue Arbeiten von Zilva¹⁾ aus dem Lister-Institut in London bekannt geworden. Der Forscher hat über ähnliche Dinge gearbeitet wie wir. Zilva's Befunde, so weit sie hier interessieren, sind, kurz zusammengefaßt, folgende: Der Forscher hat in der antiskorbutischen Fraktion des Zitronensaftes einen reduzierenden Körper festgestellt, der Phenolindophenolfarbstoff reduziert. Er hat direkt Phenolindophenolfarbstoff und nicht unser 2,6-dichlorsubstituiertes Produkt angewendet. Zilva hat auch die Übereinstimmung der Eigenschaften von Vitamin und reduzierendem Körper festgestellt. Er behauptet aber auf Grund seiner Untersuchungen, daß die beiden Körper C-Vitamin und reduzierender Körper doch nicht identisch, sondern verschieden seien. Die hauptsächlichsten Gründe für diese Behauptung sind folgende: a) Bei bestimmten Bleifällungen von Zitronensaft hat er Fraktionen erhalten, die wenig reduzierenden Körper, aber viel Antiskorbuticum enthielten. b) Bei bestimmten Bleifällungen hat er ferner reduzierenden Körper ohne antiskorbutische Wirkung gefunden. c) Mit Indophenolfarbstoff oxydierter Körper hat, sofort verfüttert, noch antiskorbutische Wirkung gezeigt. Der Punkt b) ist mit der Identitätsannahme nicht in Einklang zu bringen. Die Punkte a) und c) dagegen brauchen noch nicht gegen die Annahme der Identität zu sprechen. Wenn nämlich der reduzierende Körper das C-Vitamin ist, so kann man seine Wirkung im Organismus wohl darin sehen, daß er als katalytischer Sauerstoffüberträger in den Zellen wirkt. Ein gelinde oxydierter Körper könnte nun möglicherweise Sauerstoff im Organismus abgeben und an oxydierbare Körper übertragen unter erneuter Rückbildung von reduzierendem Körper. Dieser könnte ein zweites, ein drittes Mal Sauerstoff aufnehmen und abgeben usw., mit anderen Worten, er würde ein katalytisch wirkender Sauerstoffüberträger sein. Wir haben beim Studium der Oxydierbarkeit des reduzierenden Körpers interessante Feststellungen gemacht. Nach unseren Feststellungen zeigt der Körper gegen verschiedene Oxydationsmittel eine sehr verschiedene Oxydierbarkeit. Durch Luft wird er letzten Endes irreversibel oxydiert, durch Wasserstoffsuperoxyd wird er bei kurzer Einwirkung nicht oxydiert. Wenn man Wasserstoffsuperoxyd zugibt, so kann man den reduzierenden Körper in unveränderter Weise neben Wasserstoffsuperoxyd nachweisen und titrieren. Die Oxydation mit Indophenol ist deshalb möglicherweise ein reversibler Vorgang. Ist dieses aber der Fall, so ist natürlich auch der oxydierte Körper noch wirksam, bevor er weiter oxydiert ist. Für diese Annahme spricht der Befund Zilva's, daß der mit Phenolindophenol oxydierte Körper nur dann antiskorbutisch wirksam blieb, wenn er sofort verfüttert wurde, später aber nicht mehr. Der mit Chlor oxydierte Körper war nach unseren Befunden nicht mehr antiskorbutisch wirksam. Hier liegt also offensichtlich eine andere Art der Oxydation, vermutlich eine irreversible Oxydation vor.

Zilva gibt auch an, daß der reduzierende Körper immer mit dem Antiskorbuticum vergesellschaftet ist. Er gibt weiter an, daß, wenn der reduzierende Körper zerstört wird, auch die antiskorbutische Wirksamkeit zerstört wird. Er erklärt sich die Gegenwart des reduzierenden Körpers so, daß die Natur dem Vitamin durch diesen Körper ein stabilisierendes Reduktions-Oxydations-System zugegeben habe, das durch die Erhaltung des Potentials das Vitamin vor Zersetzung schützen soll.

¹⁾ Biochem. Journ. 1927, **21**, 354, 689, 1121; 1928, **22**, 779.

Hier seien auch noch die Arbeiten von zwei französischen Forschern, Bezssonoff und Agopian¹⁾ erwähnt, die schon vor einer Reihe von Jahren behauptet haben, daß es ihnen gelungen sei, C-Vitamin aus Weißkohl darzustellen. Sie haben ihre Verfahren der Herstellung sogar patentieren lassen. Auffallend ist, daß diese scheinbar zur industriellen Verwertung vorgenommenen Arbeiten von der Wissenschaft bisher so gut wie völlig abgelehnt sind. Bezssonoff und Agopian behaupten, daß sie aus Weißkohl einen kristallisierten Körper erhalten haben, den sie für das Glykosid eines Polyoxyphenols halten. Auch dieser Körper besaß ein starkes Reduktionsvermögen und wurde durch Arbeiten unter Stickstoff gewonnen. Das Molekulargewicht wurde zu 200—230 ermittelt. Der Körper soll auch antiskorbutisch stark wirksam gewesen sei. Mit unserem Körper scheint er aber nicht identisch zu sein, einmal weil wir den Körper nicht zum Krystallisieren bringen konnten, dann auch weil bei unserem Produkt die Gerbstoffreaktionen negativ verliefen, während ein Polyoxyphenol Gerbstoffreaktionen zeigen müßte. Die Forscher haben auch bei ihren Darstellungsgänge zum Teil in alkalischer Lösung gearbeitet, was unseren Körper vernichten oder zum mindesten schwer schädigen müßte. Vielleicht hat es sich um ein Zersetzungsprodukt des eigentlichen Körpers gehandelt.

VI. Nachweis und Bestimmung des antiskorbutischen Vitamins in Lebensmitteln mit Hilfe des 2,6-Dichlorphenolindophenolfarbstoffes.

Wir bearbeiten natürlich das ganze Problem weiter und werden dabei auch Gelegenheit nehmen, die Befunde Zilva's nachzuprüfen. Sollte sich dabei doch noch die Identität des reduzierenden Körpers mit dem C-Vitamin beweisen lassen, so hätte man ohne weiteres in der Farbstofftitration eine einfache Methode zur Bestimmung des Antiskorbuticums. Erweisen sich aber endgültig reduzierender Körper und C-Vitamin als verschiedene Stoffe, so sei für die Bewertung der Titrationsmethode nochmals auf folgendes hingewiesen: Nach unseren Befunden ist immer eine ungefähre Parallelität zwischen dem Gehalt an C-Vitamin und reduzierendem Körper vorhanden. Nach Zilva's Befunden ist der reduzierende Körper immer vergesellschaftet mit dem C-Vitamin. Das Vitamin geht schnell zugrunde, wenn der reduzierende Körper oxydiert wird. Deshalb ist es nach meiner Ansicht in jedem Falle möglich, auch wenn der reduzierende Körper nicht mit dem C-Vitamin identisch ist, sondern dieses nur immer begleitet, das C-Vitamin durch die Farbstofftitration zu messen in ähnlicher Weise, wie man in der Lebensmittelchemie z. B. den Eigehalt von Lebensmitteln am Lecithingehalte mißt. Nachprüfungen der Methode parallel mit biologischen Methoden wären besonders erwünscht.

Man verfährt für die Untersuchung pflanzlicher Teile auf C-Vitamin folgendermaßen: 25 bis 50 g des zu untersuchenden pflanzlichen Produktes werden schnell fein zerkleinert, in 100 ccm 5%-iger Schwefelsäure aufgeschwemmt und fortgesetzt Stickstoff durchgeleitet. Man kocht im Stickstoffstrom kurz auf, bis die Pflanzenzellen sich gut voneinander gelöst haben, kühlt sofort im Stickstoffstrom ab und gießt durch ein Gazefilter. Die abgessene Flüssigkeit wird auf 200 ccm aufgefüllt. Davon entnimmt man so viel, wie 5 oder 10 g pflanzlicher Substanz entspricht. In dieser Flüssigkeit wird zunächst mit starker Natronlauge der größte Teil der Schwefelsäure abgestumpft. Die noch saure Flüssigkeit wird dann mit festem Natriumacetat versetzt,

¹⁾ Siehe R. Berg, Die Vitamine. Leipzig 1927, S. Hirzel (S. 424—429).

bis nur noch freie Essigsäure und überschüssiges Natriumacetat, aber keine freie Schwefelsäure mehr vorhanden sind. Dieses ist der Fall, wenn bei dem nun folgenden Titrieren mit Farbstofflösung der einlaufende Farbstoff blau bleibt und nicht rot wird. Nun wird mit 0,001 N.-Farbstofflösung die abgekühlte Flüssigkeit bis zur eben erkennbaren, bestehen bleibenden Blaufärbung titriert. Das Resultat wird angegeben als ccm 0,001 n für 10 g Substanz.

Die Herstellung des Farbstoffes geschieht, wie von uns angegeben¹⁾. Ich habe ferner die Firma Dr. Theodor Schuchardt, G. m. b. H., Chemische Fabrik in Görlitz veranlaßt, den Farbstoff herzustellen und in den Verkehr zu bringen. Er kann von dort zum Preise von etwa 10 RM. für 1 g bezogen werden. Eine ungefähr 0,001 normale Lösung bereitet man, indem man eine Messerspitze Farbstoff in einen Literkolben bringt, destilliertes Wasser aufschüttet, durch Zugabe von Phosphatlösung der Stufe 7 nach Sörensen auf die Wasserstoffstufe 7 bringt, bis zur Marke auf-füllt, mischt und einige Zeit unter öfterem Umschütteln stehen läßt. Die Phosphat-lösung wird hergestellt durch Vermischung von einem Teil n/15 primären Kalium-phosphates mit zwei Teilen n/15 sekundären Natriumphosphates²⁾. Die filtrierte Lösung ist etwa 0,001-normal. Sie ist dann mit Titantrichlorid und Ferriammonsulfatlösung in der Weise einzustellen, daß eine etwa 0,01 N.-Titantrichloridlösung³⁾ einerseits mit der Farbstofflösung, andererseits mit 0,01 N.-Eisenalaunlösung unter Verwendung von Rhodan als Indicator titriert wird.

Vorsitzender: Ich danke Ihnen, Herr Kollege Tillmans, für den Vortrag über Ihre hochinteressanten mühevollen Arbeiten, die Sie zu diesem Ziele — wenn es auch noch nicht ganz erreicht ist — geführt haben. Ich glaube, wir dürfen als Nahrungsmittelchemiker stolz darauf sein, daß es Herrn Kollegen Tillmans gelungen ist, auf einem bisher vollständig dunklen Gebiete so weit vorzudringen, und wir wünschen, daß er recht bald zu dem vollständigen Ziele seiner Arbeit gelangen möge.

Wünscht jemand das Wort zu dem Inhalt des Vortrages? Ich glaube, den meisten kommen die Resultate so überraschend, daß Sie nicht in der Lage sind, auf die Sache näher einzugehen. So danke ich Ihnen, Herr Kollege Tillmans, nochmals für Ihre Ausführungen.

Wir kommen nun zum nächsten Punkt, den Vortrag von Herrn Dr. Remy über die „Bedeutung biologischer Untersuchungsmethoden für die praktische Nahrungs-mittelchemie“.

Die Bedeutung biologischer Untersuchungsmethoden für die praktische Nahrungsmittelchemie.

Von

Dr. E. Remy.

Abteilungsvorstand am Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

Die Anwendung biologischer Methoden in der praktischen Nahrungsmittelchemie hat sich im Laufe der Zeit in vielen Fällen als unbedingt notwendig erwiesen für eine exakte Beurteilung sowohl verfälschter als auch unverfälschter Nahrungsmittel.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1928, 56, 272.

²⁾ Siehe u. a. bei Michaelis: Praktikum der physikal. Chemie. Berlin, J. Springer, 1826.

³⁾ Entsprechend verdünnte käufliche Lösung.