

ÜBER EINE NEUE MIKROSTATISTISCHE METHODE ZUM NACHWEIS VON VERFÄLSCHUNGEN PULVERIGER SUBSTANZEN, DARGESTELLT AN DER VERFÄLSCHUNG VON GEMAHLENEM SCHWARZEN PFEFFER MIT PFEFFERSCHALEN.

I. Mitteilung.

Von

E. GRÜNSTEIDL (Wien) und T. STOBIECKI (Lwów).

(Eingelangt am 8. Oktober 1936.)

I. Prinzip der Methode.

In der Warenprüfung zählen bekanntlich jene Aufgaben zu den schwierigeren, in welchen die Ware durch einen normalerweise im Warenkörper vorkommenden, an sich wertlosen Bestandteil gestreckt wird. Hier können nur quantitative Methoden zum Ziele führen. Gewöhnlich bewähren sich in solchen Fällen die chemischen Methoden ausgezeichnet und speziell von der Ausgestaltung der Mikromethodik können wir hier noch viel erhoffen. Wenn aber die chemisch erfaßbaren Grenzwerte zu unscharf werden und durch geeignete Prozeduren sogar vorgetäuscht werden können, dann steht man, wie z. B. bei der Verfälschung von gemahlenem schwarzen Pfeffer mit gemahlenen Pfefferschalen vor einem bisher mitunter unlösbaren Problem. In solchen Fällen hat man speziell bei Pflanzenpulvern verschiedentlich die Methodik, die wir „mikrostatistisch“ nennen, anzuwenden versucht. Es handelt sich dabei um mikroskopische Auszählmethoden. Es wird irgendeine Zellenart oder ein Gewebeelement als Indiz gewählt und die Häufigkeit seines Vorkommens gegen eine Bezugsgröße in Vergleich gesetzt.

Die Methoden sind speziell dann, wenn Einzelzellen als Bestimmungselemente gewählt wurden, schwierig und mühsam und verlieren dadurch sehr an Genauigkeit. Wesentlich erleichtert wird jedoch die Arbeit durch Anwendung des Fluoreszenzmikroskopes, wobei nicht einzelne Zellen, sondern ganze, in charakteristischen Farben leuchtende Gewebsfragmente, wie sie ja in Pflanzenpulvern normalerweise vorkommen, zur Beobachtung gelangen. Voraussetzung dafür ist, daß die auftretenden Fluoreszenzfarben für eine Unterscheidung genügend charakteristisch sind. Wo dies nicht der Fall ist, wird mitunter eine selektive Präparation der Probe mit

entsprechenden Fluorophoren einen Ausweg bieten, was jedoch nach Abschluß der diesbezüglichen Untersuchungen einer weiteren Mitteilung vorbehalten bleiben muß.

Je nach der Wahl der Bezugsgröße, mit der die Zahl der in Frage kommenden Teilchen in Vergleich gesetzt wird, kommen im Prinzip zwei Ausführungsarten in Frage: entweder man vergleicht die Zahl der einen Teilchenart mit der einer wohldefinierbaren anderen Art und bildet durch die Division der beiden Werte einen neuen, den wir „Vergleichszahl“ nennen, oder man zählt nur die eine Teilchenart und setzt die erhaltene Zahl mit dem Gewicht der angewendeten Probe in Relation und erhält so den „Normalzahl“ genannten Wert. Die „Vergleichsmethode“ kann nur dann angewendet werden, wenn neben der zu bestimmenden Teilchenart eine zweite in entsprechender Art und Zahl vorkommt und hat natürlich zur Voraussetzung, daß das Verhältnis der beiden nicht zufälligen, unbeherrschbaren Schwankungen unterworfen ist. Die Gewichtsmethode erscheint, das Auftreten einer bestimmbareren Teilchenart vorausgesetzt, solchen Einschränkungen prinzipiell nicht unterworfen.

Da bei unserer Methode nicht Einzelzellen, sondern Gewebsfragmente zur Zählung kommen, deren Größe ja von den verschiedenen angewendeten Darstellungsmethoden abhängt, was natürlich stets wechselnde Versuchsbedingungen zur Folge hat, mußten diese in einer jederzeit reproduzierbaren Art geschaffen werden. Es steht fest, daß sowohl die Vergleichs- wie die Normalzahl verschieden sind, je nachdem, ob die Probe aus großen oder kleinen Teilchen besteht. Dies ist für die „Gewichtsmethode“ ohneweiteres verständlich, da es nicht gleich ist, ob auf ein bestimmtes Gewicht eine kleinere Zahl großer oder eine größere Zahl kleiner Teilchen kommt. Theoretisch sollte die Vergleichszahl von diesem Umstand unbeeinflusst bleiben, was aber in der Praxis nicht der Fall ist, da die einzelnen Gewebeteile sich bei der Vermahlung verschieden verhalten und nicht alle bei der technischen Vermahlung im gleichen Verhältnis verfeinert werden. Zur Umgehung dieser Schwierigkeiten haben wir für die Vorbereitung der Probe eine Siebanalyse mit genormten Sieben eingeführt. Anfänglich wurde versucht, für den speziellen Fall durch die Siebanalyse in bezug auf die Teilchengröße drei Typen aufzustellen, denen entsprechende Grenzzahlen zugeordnet wurden. Diese Art erwies sich jedoch bald als unzuweck-

mäßig und wir gingen dazu über, die Proben durch eine Nachvermahlung auf einen standardisierten Zerkleinerungsgrad zu bringen, der ebenfalls durch eine Siebanalyse bestimmt wird. So finden wir mit je einer Grenzzahl das Auskommen und sind von allen Zufällen der technischen Vermahlung unabhängig.

Die Methode ist prinzipiell überall dort anwendbar, wo in einer gepulverten Substanz, deren Einzelteilchen in bekannten, gut definierbaren Fluoreszenzfarben leuchten, ein fremder Bestandteil mit einer charakteristischen Fluoreszenzfarbe beobachtet werden kann, oder ein normal vorkommender Bestandteil in einem qualitäts-schädigenden Übermaß nachgewiesen werden soll. Die Methode ist, dem Charakter ihrer Aufgabe entsprechend, eine quantitative; auf die Einzelheiten der Durchführung wird im nächsten Abschnitt genau eingegangen werden.

II. Der Nachweis von vermahlenden Pfefferschalen in gemahlenem schwarzen Pfeffer.

Der Wert einer neuen Methode kann nur richtig abgeschätzt werden, wenn die bisher angewendeten Verfahren einer kritischen Betrachtung unterworfen werden; in unserem Fall also sind es die chemischen Methoden, die in manchen Staaten offiziell anerkannt und vorgeschrieben wurden.

Von den vielen Verfälschungen, denen schwarzes Pfefferpulver ausgesetzt ist, ist die mit Pfefferschalen sehr häufig. Die Pfefferschalen fallen bei der Gewinnung des weißen Pfeffers an, der bekanntlich aus reifem Pfeffer erzeugt wird, indem man diesen in Wasser einlegt und dann von der Schale befreit. Der Abfall, der einen geringeren Gewürzwert besitzt, wird zum Strecken normalen schwarzen Pfefferpulvers verwendet. Schalen fallen außerdem noch bei der Erzeugung des sogenannten „englischen Pfeffers“ an. Dabei wird schwarzer Pfeffer durch Polieren von der festsitzenden Schale befreit und das zurückbleibende Korn unrechtmäßigerweise als „weißer Pfeffer“ verkauft. Ein Zusatz der Abfälle beider Prozesse zu gemahlenem schwarzen Pfeffer kann mit dem Mikroskop nur sehr schwer und jedenfalls nicht quantitativ erkannt werden. Man kann höchstens durch Aufhellen des Präparates, z. B. mit Chloralhydrat und Jod die Beimengung der Schalen bei großer Erfahrung eventuell gegen ein Testpräparat schätzen. Auch die Beobachtung im auffallenden Licht kann Anhaltspunkte für eine Verfälschung

mit Pfefferschalen geben. Liegt die Verfälschung unter 50% und haben die Schalen den gleichen Vermahlungsgrad wie das reine Pfefferpulver, dann versagt auch die Schätzung; man war daher bemüht, verlässlichere chemische Methoden auszuarbeiten. Nach J. KÖNIG¹ sind die Pfefferschalen vor allem durch ihren großen Zellulose-, Pentosan- und Aschegehalt ausgezeichnet, während der Gehalt an Stärke und Piperin kleiner ist. Für den Nachweis eines künstlichen Schalenzusatzes hat man die Bestimmung der Stärke² von Furfurol als Furfurolhydrason⁴, von Piperin⁴, die sogen. Bleizahl⁵ und die Bestimmung des Rohfasergehaltes vorgeschlagen. E. SPÄTH^{6,7}, J. KÖNIG¹ und F. HÄRTEL u. R. WILL³ betrachten die letztere auf Grund eines umfangreichen Versuchsmaterials als die beste Methode und es wurden die chemischen Methoden in die betreffenden Gesetze oder Vorschriften verschiedener Länder aufgenommen. Das österreichische Lebensmittelbuch⁸ spricht z. B. ein Pfefferpulver, das mehr als 17,5% Rohfaser hat, als verfälscht an. Studiert man die chemische Zusammensetzung des schwarzen Pfeffers, so erkennt man, daß es Fälle geben muß, da die Verfälschungen nicht mit Sicherheit erkannt werden können (siehe Tab. 1). Bereitet man z. B. eine Verfälschung aus 43 g schwarzem Pfeffer mit einem Rohzellulosegehalt von 8,7% und aus 57 g Schalen von 24% Rohzellulose, so müßte die Mischung 17,42% Rohzellulose ergeben, ein Wert, der trotz einer 57%igen Verfälschung noch innerhalb der erlaubten Grenzen liegt. Bei dieser Berechnung wur-

¹ I. KÖNIG. Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. III. Band, 3. Teil. 1918.

² F. HÄRTEL, Untersuchung und Beurteilung von gemahlenem Pfeffer. Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel **13**, 665 (1907).

³ Untersuchung und Beurteilung von Pfeffer. Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel **14**, 567 (1907).

⁴ E. BAUER u. A. HILGER, Beiträge zur chemischen Kenntnis der Pfefferfrucht. Forsch.-Ber. f. Lebensm. **3**, 113 (1896).

⁵ W. BUSSE, Über Gewürze, Pfeffer. Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **9**, 509 (1894).

⁶ Zur Prüfung und Beurteilung des gemahlene schwarzen Pfeffers. Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel **9**, 571 (1905); Vorschläge des Ausschusses des Vereins Deutscher Nahrungsmittelchemiker zur Abänderung des Abschnittes Gewürze der Vereinbarungen. Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel **10**, 16 (1905); **12**, 12 (1906).

⁷ Gewürze. H. THOMAS, Handb. d. prakt. u. wissenschaftl. Pharmazie, III. Bd., I. Teil.

⁸ Das österreichische Lebensmittelbuch. Codex alimentarius austriacus. II. Ausgabe.

Tabelle 1.

Zusammensetzung in %	Schwarz. Pfeffer			Leere Körner		Schalen	
	Untere Grenze	Obere Grenze	Mittel	Untere Grenze	Obere Grenze	Untere Grenze	Obere Grenze
Wasser	8,0	15,7	12,5	12,0	13,0	9,0	11,5
Äther-Öl	1,2	3,6	2,25	1,6	2,1	0,8	1,0
Piperin	4,6	9,7	7,5	4,3	6,7		4,7
Piperidin	0,4	0,8	0,6	—	—	0,7	
Harz	0,3	2,1	1,05	0,94	0,96	1,19	1,28
Alkohol. Auszug	6,4	16,6	10,3	—	—	6,3	10,2
Stärke (Glukosewert)	30,0	47,8	36,5	4,4	5,6	11,5	23,6
Pentosan	4,0	6,5	5,0	—	—	8,5	11,13
Rohzellulose	3,7	17,5	14,0	30,4	32,6	24,0	48,0
Asche	3,0	7,4	5,15	7,4	8,5	6,8	51,4

den Pfeffer und Schalen mit unteren Grenzwerten für Zellulose angenommen, also Materialien, denen man seltener begegnet. Nimmt man dagegen Pfeffer mit einem mittleren Rohfasergehalt von 14% und Schalen mit einem Gehalt von 25,61% an, dann wird zwar die Fälschungsmöglichkeit geringer werden, wird aber immer noch beträchtlich sein; der angenommene Rohfasergehalt der Schalen entspricht ungefähr dem der von der Erzeugung des weißen Pfeffers anfallenden Schalen, deren Gehalt nach F. HARTEL und R. WIL³ zwischen 24,34% und 26,88% schwankt. Eine Mischung dieser beiden Komponenten mit 30% Schalen, zeigt einen Rohzellulosegehalt von 17,48%. Verfasser hatten Gelegenheit, in einer Sammlung auf Grund derartiger Überlegungen eingestellte Schalenmischungen zu betrachten, die als „analysenfeste Ware“ auf den Markt gebracht wurden. Es ist bei dieser Sachlage verständlich, daß in der Handelspraxis den chemischen Methoden kein besonderes Vertrauen entgegengebracht wird.

Diese theoretischen Überlegungen wurden experimentell überprüft, wofür 27 Pfefferproben verschiedener Herkunft zur Verfügung standen. Sie wurden als $\frac{1}{2}$ kg-Durchschnittsproben der Engroswaren entnommen und bei Importfirmen in London, Le Havre, Hamburg, Triest, Gdynia und Danzig erworben. Die einzelnen Firmen wurden nach Konsulatsauskünften ausgewählt und man kann ihren Provenienzangaben Vertrauen schenken. Außerdem standen je zwei fabrikmäßig gemahlene Pfefferproben aus Triest, von französischen Firmen und von einer Wiener Gewürz-

mühle zur Verfügung, welche Proben noch durch solche aus dem Detailhandel ergänzt wurden. Von den ganzen Pfefferproben wurde das äußere Aussehen, der meist geringe Gehalt an beigemengten Schalen und Stengeln und an leeren Körnern, sowie das 1000 Körnergewicht bestimmt, welche Daten in Tab. 2 zusammengestellt sind.

Tabelle 2.

Nr.	Sorte	Farbe	1000 Körner gewicht	0/100 an tauben Körnern	0/100 kleine Körner die durchgehen durch		0/100 an Schalen	0/100 an Stengel	100 Körner- gewicht nach anderen Autoren
					Sieb II	Sieb III			
1	Tellychery	Hellbr.— Schwbr.	43,85	0,22	—	—	—	—	4,85 HÄRTEL WILL.
2	"	"	46,99	—	—	—	—	—	4,22 HARTWICH
3	"	Hellbr. bis zu Dunkbr.	45,0	—	—	—	—	—	—
4	Singapore	Dunkbr.— Schwarz	33,62	5,6	3,1	0,1	0,7	—	4,1 HÄRTEL 4,56 WILL.
5	"	"	36,21	1,43	3,7	2,0	2,4	—	
6	"	Hellbr.— Schwarz	35,2	6,6	5,2	3,5	5,1	0,2	
7	Aleppy	Hellbr.— Dunkbr.	38,6	0,26	0,3	—	—	—	3,76 HÄRTEL WILL. 3,82 HARTWICH
8	"	"	43,17	—	—	—	—	—	
9	Borneo	Schwbr.— Schwarz	48,55	2,18	—	—	—	—	
10	Malabar	Gelbbraun— Dunkbr.	40,96	0,25	1,0	—	0,35	1,5	
11	Lamong	Braun bis Schwarz	32,36	0,3	0,6	—	0,2	—	
12	"	"	30,74	0,4	0,8	0,5	0,6	—	
13	"	"	38,0	1,2	1,0	0,8	0,5	0,3	3,2 3,54 HÄRTEL WILL.
14	"	"	33,8	1,9	0,3	—	—	0,5	
15	"	"	34,4	1,8	2,0	1,6	0,8	0,5	
16	"	"	30,2	6,0	1,4	—	0,2	0,15	
17	"	"	35,6	2,8	0,6	—	0,1	0,1	
18	"	"	36,4	1,6	1,6	—	0,2	0,15	
19	"	"	33,0	1,26	2,4	—	—	0,2	

Der Gehalt an leeren Körnern wurde durch Zerdrücken von 250 Körnern zwischen den Fingern und Wägen bestimmt. Die Tabellenwerte sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen. Da nach unseren Erfahrungen speziell die kleinen Körner von Einfluß auf verschiedene Analysenwerte sind, wurde der Anteil der kleinen Körner bestimmt. Als kleine Körner bezeichnen wir solche, die durch ein Sieb von 3 mm Maschenweite gehen, entsprechend dem Sieb Nr. 2 nach dem D.A.B. VI. Die Anzahl dieser kleinen Körner bleibt nicht ohne Einfluß auf die chemische Zusammensetzung der Durchschnittsprobe eines Pfeffers, worauf in diesem Zusammenhange jedoch nur hingewiesen sei. Von den in Tab. 2 angeführten Proben, die bis auf Probe Nr. 6 Normalware darstellen, wurden Vermahlungsproben hergestellt, die durch ein Sieb Nr. 5 hindurchgehen. Die Proben wurden zu diesem Zwecke erst grob auf einer Handgewürzmühle vorgemahlen und dann auf einer Kaffeemühle der Firma PUGEOT fein vermahlen. Das so erhaltene Material wurde durch Sieb Nr. 5 durchgeseibt und der Rückstand neuerlich vermahlen, was so lange fortgesetzt wurde, bis die ganze Probe das Sieb passiert hat. Die bereits gemahlene Proben Nr. 20—27 wurden fein vermahlen und in der gleichen Weise behandelt. Von allen Proben wurde der Gehalt an Rohzellulose nach HENNEBERG und STOHMANN in der Modifikation von SPÄTH⁷ bestimmt. Das Filtrieren und das Sammeln des Rückstandes wurde mit Hilfe eines mit einer „Witt“-Platte versehenen Trichters durchgeführt, was sich als sehr bequem erwiesen hat. Es sei hier die Bemerkung eingeflochten, daß, trotzdem Pfefferpulver mit höherem Schalengehalt dunkler gefärbte Filtrate ergeben, keineswegs aus den Farben der Lösungen auf den Rohzellulosegehalt geschlossen werden kann. Die Resultate sind in Tab. 3 zusammengefaßt, wobei die Bezeichnung der Proben nach Tab. 2 vorgenommen wurde (siehe Tab. 3).

Man ersieht daraus, daß nur die Probe 26 einen Wert über 17,5 aufweist. Sie unterscheidet sich von den übrigen Proben durch eine dunklere Farbe und ist am ehesten mit Schalen verunreinigt. Es wurde nämlich beobachtet, daß ein Schalenzusatz eine derartige Farbenveränderung verursacht. Eliminiert man den Wert dieser Probe, so ergibt das übrige analysierte Material die Rohzellulosegrenzwerte von 12,29 bis 16,75. Sie liegen also weiter auseinander als die von HARTEL und WILL angegebenen (13,04—16,3).

Tabelle 3.

Proben- Nummer	% Roh- zellulose	Proben- Nummer	% Roh- zellulose	Proben- Nummer	% Roh- zellulose
1.	13,68	10.	14,17	19.	13,82
2.	12,50	11.	13,94	20.	16,72
3.	14,44	12.	14,20	21.	14,08
4.	14,48	13.	14,23	22.	15,88
5.	14,48	14.	13,77	23.	12,93
6.	16,75	15.	14,00	24.	13,10
7.	13,86	16.	12,29	25.	12,65
8.	13,64	17.	12,63	26.	18,55
9.	14,84	18.	12,82	27.	16,73

Mit Pfefferprobe Nr. 2 und Schalen, die als Absieb bei der Reinigung von Lampongpeffer vor der fabrikmäßigen Vermahlung anfallen, wurden künstliche Verfälschungen hergestellt. Die Proben wurden in der oben angegebenen Art durch Feinvermahlung für die Analyse vorbereitet. Es wurden sowohl die Schalen wie auch die Verfälschungen auf Rohzellulose analysiert und die Resultate in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4.

	Schalenbeimengung	% Rohzellulose
1.	10 %	15,05
2.	20 %	16,20
3.	30 %	17,43
4.	40 %	19,58
5.	100 %	29,28

Obige Werte zeigen deutlich, daß bei Wahl der entsprechenden Bestandteile Verfälschungen bereitet werden können, deren Rohzellulosegehalt sich innerhalb der erlaubten Grenzen bewegt, die

also chemisch nicht nachweisbar sind. Die zu dieser Verfälschung verwendeten Schalen haben einen verhältnismäßig hohen Zellulosegehalt, während — wie schon erwähnt — der Gehalt, der bei der Fabrikation von weißem Pfeffer anfallenden Schalen viel geringer ist. Sie werden also noch stärkere Verfälschungen gestatten. Zur Orientierung wurde von der Pfefferprobe Nr. 2, den Schalen und der 30%igen Verfälschung auch der Glukosewert bestimmt, der bekanntlich die Menge der errechneten Glukose auf 100 g Material angibt. Die Analysen wurden nach den Angaben des Cod. aliment. Austriacus mit der Modifikation ausgeführt, daß die Glukose maßanalytisch nach BERTRAND bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind aus Tab. 5 ersichtlich.

Tabelle 5.

Art der Probe	Glukosewert
Pfeffer Nr. 2	44,52
Schalen	16,75
30 %ige Verfälschung	36,07

Auch hier zeigt sich, daß der Wert der 30%igen Verfälschung dem eines normalen Pfeffers gleichkommt (vgl. Tab. 1), obwohl, wie oben erwähnt, diese Schalen für eine Verfälschung durchaus nicht die günstigste Zusammensetzung aufweisen. Es zeigt sich aber auch, daß mit Hilfe des Glukosewertes die Erfassungsmöglichkeit von Verfälschungen noch geringer ist, als mit der Bestimmung der Rohzellulose.

Wenn man bedenkt, daß die hier überprüften Methoden als die besten unter den chemischen bezeichnet werden, so ist das Mißtrauen, das ihnen die Praxis entgegenbringt, durchaus verständlich.

Unsere Bestrebungen gingen nun dahin, eine von dem chemischen Verfahren unabhängige, quantitative Methode zum Nachweis der Verfälschung von schwarzem Pfefferpulver mit gemahlenden Pfeffer-

ferschalen zu schaffen. Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren luminiszenzmikroskopische Untersuchungen des Pfeffers⁹.

Pfeffer zeigt im Querschnitt in den einzelnen Schichten folgende charakteristische Fluoreszenzerscheinungen:

Cuticula: Ein hell lichtgelber Saum / **Oberhaut:** dunkelbraun.

Steinzellschicht: blaugrün (mitunter ist ein geringer grauer oder gelblicher Stich zu beobachten).

Äußere Parenchymschicht: schmutzigbraun (eigentlich nur die Farbe der Zellwände).

Leitbündelschicht: rehraun / **Ölzellschicht:** schmutzig elfenbeinfarben.

Innere Steinzellschicht: (Becherzellen) blaugrün / **Samenhaut:** braun.

Hyaline Schicht: ein hellblauer Streif. / **Aleuronschicht:** hellgraugelb.

Stärkeparenchym: graublau / **Harzzellen:** gelb.

Im schwarzen gemahlene Pfeffer beobachtet man unter dem Fluoreszenzmikroskop Zellkomplexe, die in den beschriebenen Farben des Querschnittes leuchten, wobei durch die verschiedene Dicke der Teilchen auch verschiedene Farbnuancen auftreten. Hauptsächlich sehen wir graublau leuchtende Teilchen. Einen bedeutenden Anteil bilden die grünlichen und blaugrünen Teilchen, sowie dunkle, die schwarz bis hellbraun erscheinen. Man kann im Fluoreszenzbild des gepulverten schwarzen Pfeffers zwei Gruppen, nämlich hell und dunkel fluoreszierende Anteile, unterscheiden. Übergangsformen treten weniger auf. Es wurde schon seinerzeit darauf hingewiesen, daß mit Rücksicht darauf, daß die Schalen vornehmlich dunkelbraun leuchten, ein künstlicher Zusatz derselben eine Steigerung der Zahl der dunklen Teilchen bedingen müßte, was im Vergleich mit einem Testpräparat erkannt werden könnte. Da aber die auftretenden Unterschiede sehr gering sind, war es notwendig, einen zahlenmäßigen Ausdruck dafür zu finden, was mit der im 1. Abschnitt dargelegten Methode gelingt.

Die „Vergleichszahl“ wird im vorliegenden Fall durch Division

⁹ E. GRÜNSTEIDL, Die luminiszenzmikroskopische Gewürzprüfung. Ztschr. Unters. Lebensm. 63, 425 (1932).

der Zahl der hellfluoreszierenden mit der der dunkelfluoreszierenden erhalten. Es nimmt also dieser Wert mit steigendem Schalen- gehalt ab. Um hier ein der „Normalzahl“ analoges Verhalten zu erreichen, haben wir vor, in der Zukunft den reziproken Quotien- ten zu bilden, so daß beide Werte mit zunehmendem Schalen- gehalt auch steigen. Die „Normalzahl“ gibt die Zahl der dunkel- fluoreszierenden Teilchen auf ein Milligramm Substanz an. Schon die ersten Versuche zeigten, daß die Ergebnisse in hohem Maße von der Vorbereitung des Materials, von der Entnahme einer rich- tigen Durchschnittsmikroprobe, dem Aussieben und der Zählung abhängen, Bedingungen, die in einer langen Versuchsreihe fest- gelegt wurden. Die nachfolgenden Versuchsanleitungen resultie- ren aus den daraus geschöpften Erkenntnissen und sind absichtlich oft bis ins kleinste Detail mitgeteilt. Man muß sich vor Augen halten, daß es sich um sehr subtile Methoden handelt, bei welchen die Prüfungen nur mit wenigen Zehntelmilligrammen durchgeführt werden, so daß also, wie bei vielen Mikromethoden, bereits aus einer unrichtigen Arbeitsweise schwere Fehlerquellen entstehen können.

Die Vorbereitung der Probe für die Vergleichs- methode wird in folgender Weise durchgeführt:

1. Vermahlen der Probe bis zum vorgesehenen Feinheitsgrad.
2. Trocknen an der Luft.
3. Entnahme einer Durchschnittsmikroprobe.
4. Aufstreuen auf den Objektträger.

Über die Vermahlung wurde bereits oben gesprochen, wobei auch auf die Notwendigkeit der Normalisierung des Vermahlungsgrades durch eine Siebanalyse hingewiesen wurde, wie sie auch für das ganze Versuchsmaterial durchgeführt wurde; die Ergebnisse sind aus Tabelle 8 zu entnehmen. Der Rückstand ist prozentmäßig auf die Siebe Nr. 6 und 7 bezogen; es wurde nämlich außer den norma- lisierten Sieben Nr. 5 und 6 noch ein Sieb Nr. 7 (Maschenweite 0,075 mm) eingeführt. Es sei betont, daß, obwohl durch die Normalsiebung die Werte der Proben untereinander in den einzelnen Fraktionen oft stark genähert sind, trotzdem häufig Teil- chen sehr verschiedener Größe beobachtet wurden. Speziell bei der dritten Fraktion wurden größere Spannweiten der Werte ge-

gefunden und bei den fabrikmäßig vermahlenden Proben fiel ein sehr feiner Absieb auf. Trotzdem bei unseren Proben kein engerer Zusammenhang zwischen Teilchengröße einerseits und Mahltechnik und spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Sorten andererseits gefunden werden konnte, eignet sich das durch die angegebene Normalisierung erhaltene Material durchaus zu praktischen Vergleichen.

Nach dem Vermahlen wird der Pfeffer durch 24 Stunden an der Luft getrocknet. Das Pulver verliert dadurch nicht nur an Feuchtigkeit, sondern auch etwas an leichtflüchtigen Ölen; es fließt daraufhin bedeutend leichter und kann besser gesiebt werden. Sofort nach dem Mahlen aufgestreut, bildet das Pulver auf dem Objektträger kleine Bröckchen, wodurch das Zählen sehr behindert wird. Eine Trocknung bei erhöhter Temperatur erwies sich als unzweckmäßig, da das Pfefferpulver dadurch hygroskopisch wird; es nimmt in der Folge durch längere Zeit an Gewicht zu, was speziell bei der Gewichtsmethode sehr störend wirkt.

Als Vorbereitung für die Entnahme der Mikroprobe wird das Pulver vorerst in einem Pulverglas durch entsprechendes Schwenken gründlich gemischt. Nunmehr wird aus 20—40 g ein kleines Häufchen gebildet, bei dem durch leichtes Aufdrücken einer Glasplatte an einer Seite eine glatte Oberfläche gebildet wird (Abb. 1). In diese wird ein entsprechend geformter Mikrospatel 0,5 mm tief waagrecht eingetaucht, worauf man ihn in die Höhe hebt, so daß eine Probe im Ausmaß von 0,5 mm² entnommen wird. Der Spatel besteht aus einem Stahlstäbchen (Abb. 1 a), das an seinem Ende eine vierkantige, 1 mm breite Schneide besitzt. Die Konsistenz des Pulvers auf dem Spatel gestattet ein bequemes Übertragen der Probe, ohne daß davon auch bei leichtem Neigen des Spatels etwas verschüttet wird. Diese Mikroprobe wird auf einem Objektträger verteilt, der in der Mitte ein Meßquadrat von 1 cm Seitenlänge trägt, das in Quadratmillimeter untergeteilt ist. Der Objektträger wird mit einer Messingmaske (Abb. 1, b) überdeckt, die in der Mitte eine mit dem Meßquadrat korrespondierende Öffnung besitzt. Der genaue Sitz der Maske wird durch eine entsprechende Führung gewährleistet^{9a}.

^{9a} Die zur Durchführung der Methode nötigen Geräte können von der Fa. C. Reichert, Wien, bezogen werden.

Das Aufstreuen der Probe auf den Objektträger wird mit einem Pinsel durchgeführt. Es wurden auch verschiedene andere Arten des Aufstreuens versucht, doch hat sich die einfache Arbeit mit dem Pinsel als am zweckmäßigsten erwiesen. Wir verwenden einen kleinen Haarpinsel, dessen Durchmesser beim Haaransatz 3 mm und dessen maximale Haarlänge 17 mm beträgt. Eine Reinigung

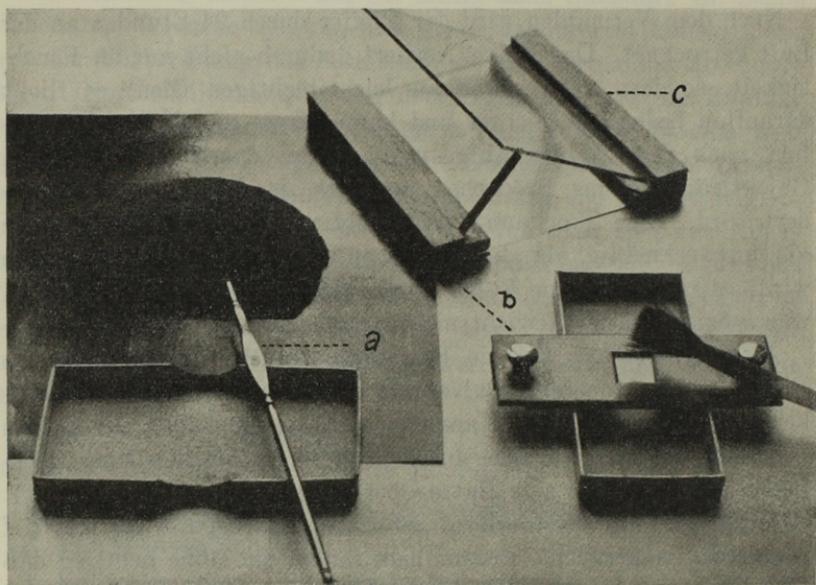


Abb. 1.

des Pinsels mit Alkohol und ein Ausputzen mit der Präpariernadel kommt bei der Vergleichsmethode nicht in Frage. Er würde sonst eine bedeutende Menge kleinster Teilchen durchlassen, die das Zählen sehr mühsam gestalten würden. Der Pinsel soll im Gegenteil diese Teilchen wie ein Filter zurückhalten. Seine Vorbehandlung besteht lediglich darin, daß er in das Pfefferpulver eingetaucht und dann ausgeblasen wird, wobei man die Haare auseinanderteilt. Es ist selbstverständlich, daß der Pinsel vor Staub geschützt aufbewahrt werden muß.

Zum Ausstreuen der Probe wird diese auf den oberen Teil des Pinsels geschüttet, wobei dieser 2—5 mm über dem Objektträger

gehalten wird. Das Ausstreuen wird mit leisem Schlag des Zeigefingers auf den Spatel bewerkstelligt, wobei gegen Ende stärker mit dem Finger geklopft werden muß. Man erreicht dadurch, daß das Pulver durch den Pinsel auf den Objektträger fällt, wobei größere Stückchen zerfallen und hauptsächlich nur Einzelteilchen zur Beobachtung gelangen, während die feinsten Teilchen und Staub von den Pinselhaaren zurückgehalten werden. Während des Ausstreuens bewegt man den Pinsel über das Meßquadrat hinweg, ohne ihn jedoch um seine Achse zu drehen. Bleibt ein Teil der Probe auf dem Pinsel, so ist dies ohne weitere Bedeutung, doch muß beachtet werden, daß der Rückstand nur einen unbedeutenden Prozentsatz der Probe darstellt und daß immer in der gleichen Weise gearbeitet wird. Diese Teilchen entsprechen der Fraktion nach Sieb Nr. 7 und werden vornehmlich in fabrikmäßig vermahlener Ware gefunden. Beim Ausstreuen derartiger Proben kommt es manchmal vor, daß ein größeres Teilchen beim Durchfallen durch den Pinsel kleinste Teilchen mitreißt, die dann bei der Beobachtung meistens in der Nachbarschaft des größeren Teilchens als kleine, leuchtende Punkte erscheinen. Sie werden bei der Zählung außer acht gelassen. Beim Ausstreuen soll möglichst danach getrachtet werden, die ganze Probe auf das Meßquadrat zu bringen und nichts auf die Maske, da diese Teile für die Messung verloren sind. Die Menge der mit dem Spatel aufgenommenen Mikroprobe schwankt zwischen 0,1—0,2 mg. Die untere Grenze soll nicht unterschritten werden, da sonst die Schwankungen der Resultate zu groß werden. Über 0,2 mg soll man hingegen nicht hinausgehen, da sonst, speziell bei Proben mit einem höheren Vermahlungsgrad, die Zählung zu mühsam wird, die Teilchen oftmals unübersichtliche Zusammenballungen bilden und außerdem die Filterfunktion des Pinsels gestört wird. Nach Beendigung des Ausstreuens wird die Maske vorsichtig entfernt und der Objektträger auf den Mikroskopisch gebracht. Es wird nun noch überprüft, ob die Ausstreuung gleichmäßig ist und ob alle Teilchen einzeln liegen. Bei richtiger Ausstreuung konnten Zusammenballungen nicht beobachtet werden (Abb. 2, a und b). Manchmal kommt es vor, daß 2—3 Körnchen beisammenliegen; auch in diesem Fall sollen sie aber deutlich alle erkennbar sein, so daß jedes einzelne für sich gezählt werden kann.

Bei manchen Proben von Pfefferpulvern, die in verschlossenen Gläsern bei Licht aufbewahrt wurden, konnte ein Anlegen des Pul-

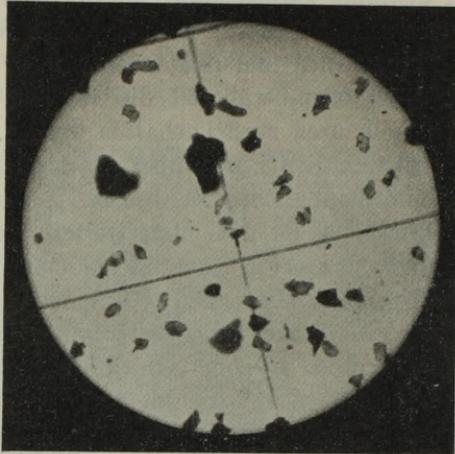


Abb. 2 a.

vers an den Wänden beobachtet werden. Solche Proben zeigten nach dem Ausstreuen zahlreiche Klümpchen, die das Zählen sehr erschwerten und große Schwankungen der Werte verursachten. Die

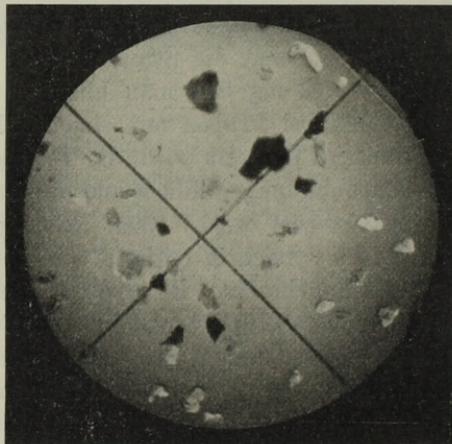


Abb. 2 b.

Ursache dieser Erscheinung wurde nicht weiter untersucht. Eine dieser Proben wurde jedoch eine halbe Stunde in Alkohol gekocht, abfiltriert und mit Alkohol nachgewaschen. Nach dem Trocknen ist die Probe leicht fließend, sie läßt sich gut aufstreuen und zeigt größere Kontraste in den Farben, so daß die Zählung sehr erleichtert ist. Es wäre durch Einführung einer derartigen Alkohol-extraktion die Methode zweifellos noch verbesserungsfähig; angesichts der ganz bedeutenden Komplizierung wurde jedoch der Gedanke vorderhand zurückgestellt.

Die Beobachtung wird immer bei der gleichen Vergrößerung vorgenommen. Wir verwenden eine 82fache Vergrößerung (Objektiv Leitz Nr. 3, Okular Nr. 3), bei der das Blickfeld gerade durch ein Teilquadrat des Meßfeldes ausgefüllt ist. Wir schieben bei der Messung den Objektträger stufenweise weiter und summieren die jeweils gezählten Teilchen. In bezug auf die Fluoreszenzfarben zählen wir zuerst die schwarzen, schwarzbraunen, braunen, gelbbraunen und die dunkelgrünbraunen, dann die hellblauen Teilchen, hellgelben, olivgrünen und schmutziggrünen. Werden hie und da Klümpchen beobachtet, die aus beiden Gruppen zusammengesetzt sind, so werden sie bei beiden Zählungen berücksichtigt. Manchmal können Teilchen oder Klümpchen beobachtet werden, die in der Grenzsphäre fluoreszieren, für deren Einreihung eine gewisse Erfahrung gesammelt werden muß. Doch ist die Zahl dieser Teilchen ganz unbedeutend, so daß die Möglichkeit von Irrtümern sehr gering ist. Die allerkleinsten Teilchen, deren Farbe bei der vorliegenden Vergrößerung nicht bestimmt werden kann, werden nicht gezählt, was sich praktisch auf das Resultat kaum auswirkt, da die Menge dieser Teilchen ebenfalls sehr gering ist.

Die Vorbereitung der Probe für die Gewichtsmethode ist bis zur Entnahme der Mikroprobe mit der bereits beschriebenen identisch, doch werden Spatel, Objektträger, Maske und Pinsel vor der Analyse mit Alkohol gereinigt. Die Mikroprobe ist für diese Methode etwas größer; man erreicht dies dadurch, daß der Spatel einen Millimeter tief in das Pulverhäufchen eingetaucht wird, wodurch die Menge auf 0,2—0,4 mg gesteigert wird. Auch hier sollen die Grenzwerte nicht unter- oder überschritten werden. Die Tech-

nik des Ausstreuens ist dieselbe wie bei der Vergleichsmethode, nur wird ein etwas größerer Pinsel verwendet; seine Breite beträgt am Haaransatz 4 mm, die Haarlänge ca. 19 mm. Im Gegensatz zur Vergleichsprobe, bei der die auf die Maske gefallenen Teilchen unberücksichtigt bleiben, werden diese bei der Gewichtsmethode mit dem kleinen Pinsel sorgfältig gesammelt und neuerdings ausgestreut, so daß sich schließlich die ganze Mikroprobe auf dem Meßquadrat befindet. Nach Abnehmen der Maske, wird der Objektträger mit einer in Alkohol gewaschenen Pinzette in eine kleine Kammer gebracht, die aus zwei in einem Holzrahmen befindlichen Glasplatten besteht (Abb. 1, c). In dieser Kammer wird die Probe auf den Mikroskopisch gelegt und ausgezählt, wobei nur die dunkelfluoreszierenden Teilchen berücksichtigt werden. Nach der Zählung wird die Kammer in die Mikrowaage gebracht, erst daselbst geöffnet und der Objektträger mit der Probe nach Erreichung der Gewichtskonstanz zur Wägung gebracht. Nachher wird das Pulver mit dem Pinsel sorgfältig entfernt und zurückgewogen; selbstverständlich darf der Objektträger während dieser Operationen niemals mit den Fingern berührt werden. Diese Reihenfolge der Operationen erwies sich als die zweckmäßigste, da anderenfalls der Objektträger öfters hin- und hergelegt werden müßte, was zu Fehlerquellen Anlaß geben könnte.

Vergleicht man die beiden Durchführungsarten der Methode, so muß man die Abhängigkeit der Werte vom Vermahlungsgrad und von der Menge der Probe, sowie die Schwankungen der Werte innerhalb einer Meßreihe beobachten.

Nach den bisherigen Beobachtungen kann gesagt werden, daß der Einfluß des Vermahlungsgrades auf die „Normalzahl“ größer ist, als auf die „Vergleichszahl“, was übrigens nach dem früher Gesagten leicht verständlich ist und in folgendem Versuch deutlich zum Ausdruck kommt.

Es wurden zwei Pfefferproben mit niedrigen und hohen charakteristischen Werten auf die früher angegebene normalisierte Art vermahlen. Die so erhaltenen Proben wurden unter der Bezeichnung 14 a und 25 a analysiert (Tab. 6). Hernach wurden die Proben durch mehrfaches Durchmahlen der Rückstände von Sieb 6

Tabelle 6.

Proben- Nummer	Rückstand auf		Normal- ziffer	Mittel- wert	Ver- gleichs- zahl	Mittel- wert
	Sieb VI	Sieb VII in %				
14 a	58,85	16,85	684	680	3,59	3,59
			673		3,60	
			678		3,49	
			752		3,58	
			611		3,71	
14 b	31,10	21,7	743	784	3,76	3,50
			695		3,37	
			868		3,79	
			780		3,60	
			834		2,98	
25 a	53,50	14,75	970	978	2,50	2,74
			910		2,62	
			1025		3,08	
			981		2,71	
			1002		2,81	
25 b	29,9	22,4	1188	1138	2,63	2,67
			1170		3,07	
			968		2,54	
			1310		2,42	
			1052		2,71	

auf einer feinhahlenden Mühle noch weitgehend zerkleinert und als Proben 14 b und 25 b abermals analysiert. Aus Tab. 6 ersehen wir, daß die Werte mit zunehmender Vermahlung gewissen Veränderungen unterliegen. Während jedoch die Veränderung der Vergleichszahl innerhalb der Fehlergrenze verbleibt, beträgt die Erhöhung für Probe Nr. 14 bis zu 15% und für Probe Nr. 25 bis 16% der früheren Werte. Bei letzterer finden wir für die Normalzahl einen Mittelwert von 1138, der, wie uns Tab. 8 zeigen wird, die obere Grenze der erlaubten Normalzahl, nach der besprochenen

Analysenart gewonnen, überschreitet. Die Rückstände beider Siebe betragen bei der Probe 25 b nur bis 52,3%. Es ist dies ein Wert, den wir bei keiner uns zur Verfügung stehenden Probe sowohl den vermahlenden und den selbst nachgemahlenden wie auch bei den aus ganzem Pfeffer durch Normalvermahlung erhaltenen Proben wieder finden konnten, deren Werte durchwegs höher lagen. Die Gefahr einer durch den oben gezeigten Umstand bedingten Fehlentscheidung ist aber nicht zu befürchten, da ja ein solches überaus fein vermahlendes Material durch die Siebanalyse sofort angezeigt wird. Es sei darauf hingewiesen, daß wir unsere Versuche fortsetzen, um einerseits einige noch nicht überprüfte Pfeffersorten zu überprüfen, andererseits an einem größeren Material handelsmäßiger Pfefferpulver den Vermahlungsgrad zu überprüfen. Sollten sich derartige Proben, wie wir sie in 14 b und 25 b selbst hergestellt haben, im Handel doch vorfinden, was speziell bei der fabrikmäßig vermahlenden Ware möglich wäre, so müßte die vorgesehene Normalvermahlung im Sinne einer weitergehenden Verfeinerung modifiziert werden.

Über den Einfluß der Menge der Mikroprobe wurde bereits weiter oben gesprochen. Die notwendige Begrenzung und Kontrolle ist bei der Gewichtsmethode automatisch gegeben. Bei der Vergleichsmethode muß die Probenmenge anfänglich mit der Mikrowaage kontrolliert werden, bis man in der Probennahme die nötige Fertigkeit und Erfahrung gesammelt hat. Als Vorzug der beiden Verfahren kann auch die kurze Versuchsdauer bezeichnet werden. Bei der Gewichtsmethode dauert eine Analyse mit einer Messung exklusive Trocknung eine Stunde, während sie bei der Vergleichsmethode noch kürzer ist, da bei dieser die Messung selbst nur 10 Minuten beansprucht; bei der Gewichtsmethode ist dazu eine halbe Stunde nötig. Die Vergleichsmethode ist rascher und einfacher, doch hängt die Erlangung übereinstimmender Resultate mehr als bei der Gewichtsmethode von der richtigen Art der Durchführung der einzelnen Versuchsphasen, von der Übung der Experimentierenden und in einem gewissen Maß von subjektiven Einflüssen ab. Vielleicht würde in der Praxis die Anwendung eines entsprechend gewählten Vergleichsmaterials vorteilhaft sein. Gegenüber der Bestimmung der „Normal-“ und „Vergleichszahl“ für Zellenelemente

nach A. MAYER¹⁰, GRIEBEL¹¹, W. PLÜCKER¹², C. H. KOPERBERG¹³, O. HEILBORN¹⁴ ist bei der vorliegenden Methode vor allem ihre Einfachheit und rasche Durchführbarkeit zu beachten. Dies ergibt sich — wie bereits früher erwähnt wurde — schon aus der Grundidee der Methode.

Die Anwendbarkeit der von uns vorgeschlagenen Methode für die Praxis hat zur Voraussetzung, daß die für eine normale Ware noch zulässigen Grenzwerte bekannt sind, die aber nur auf empirischem Wege gefunden werden können. Es wurden daher von allen zur Verfügung stehenden Proben die charakteristischen Zahlen nach beiden Methoden bestimmt. Sie wurden in Tabelle 7 und 8 zusammengefaßt, wobei zu bemerken ist, daß die Mittelwerte aus je fünf Bestimmungen errechnet wurden; nur in jenen Fällen, da die Werte an der Grenze liegen, wurden zehn Bestimmungen gemacht (Tabelle 7 und 8).

Bei der Zusammenstellung der Werte wurden die der Proben 6 und 26 eliminiert, da diese keine einwandfreie Ware darstellen. Für die Probe 6 wurden als Mittelwerte von fünf Messungen 1323 und 2,01 gefunden. Von dieser Probe ist uns aber der große Gehalt an Verunreinigungen bekannt (Tab. 2), der an Schalen, leeren und kleinen Körnern 17,10% beträgt. Wir müssen daher diese Probe für die Bestimmung der Grenzziffern von Normalware außer acht lassen. Der Gehalt an Rohzellulose dieser Probe wurde mit 16,75% bestimmt, welcher Wert nach dem Absieben der Verunreinigungen auf 15,15% sank; während unsere charakteristischen Werte nunmehr 960 und 3,21 betragen. Es wird durch diese der Einfluß der Verunreinigungen auf Vergleichs- und Normalzahl zahlenmäßig illustriert. Es haben auch kleinere Verunreinigungen einen gewissen Einfluß. Diese wurden aber bei den Proben für die Analyse nicht berücksichtigt, da sie ja auch in der Ware toleriert werden. Für die Probe Nr. 26 wurden als Mittelwerte die Zahlen 1264 und

¹⁰ Die Grundlagen u. die Methoden f. d. mikroskop. Unters. v. Pflanzenpulvern. Jena 1901.

¹¹ GRIEBEL und SONNTAG, Ztschr. Unters. Lebensm. 51, 185 (1926).

¹² W. PLÜCKER, A. STEINRUCK, T. STARK, Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel 50, 307.

¹³ Chem. Weekbl. 23, 64.

¹⁴ Svensk Botanisk Tidskrift 25, 2 (1931) u. 27, 2 (1933).

Tabelle 7.

Nummer d. Probe	Vergleichsziffer						mittl. Fehler arithm. Mittels	Variations- koeffizient in ‰
	Messung					Mittel- wert		
	1	2	3	4	5			
1	3,25	3,05	2,90	2,64	2,94	2,96	± 0,10	7,5
2	3,33	2,79	3,25	3,00	3,06	3,09	± 0,10	6,9
3	3,87	3,53	3,70	3,40	3,60	3,60	± 0,08	6,2
	3,62	3,92	3,13	3,42	3,83			
4	3,05	3,26	2,80	2,88	3,25	3,05	± 0,09	6,9
5	3,62	3,58	3,17	3,64	3,20	3,44	± 0,11	6,9
7	2,54	3,10	3,22	2,89	3,20	2,99	± 0,13	9,5
8	3,58	2,84	3,17	3,09	3,39	3,21	± 0,13	7,8
9	3,00	2,87	2,75	2,88	2,96	2,89	± 0,04	3,3
10	2,97	3,01	3,20	2,88	2,50	2,91	± 0,12	8,9
11	3,50	3,48	3,35	2,97	2,80	3,22	± 0,14	9,8
12	3,81	3,07	3,63	3,29	3,13	3,39	± 0,14	9,5
13	3,46	3,49	3,16	3,52	3,06	3,34	± 0,09	6,4
14	3,59	3,60	3,49	3,58	3,71	3,59	± 0,04	2,2
15	2,77	3,78	3,12	3,38	3,60	3,33	± 0,18	11,9
16	3,35	3,70	3,04	3,71	3,45	3,45	± 0,12	8,0
17	2,88	3,27	2,80	2,38	3,02	2,87	± 0,15	11,4
18	2,77	2,60	2,65	3,30	2,74	2,81	± 0,13	10,0
19	3,15	2,90	3,16	3,38	2,85	3,08	± 0,10	7,0
20 ¹	4,00	3,12	3,08	3,82	3,20	3,44	± 0,19	12,6
21 ¹	3,32	3,08	3,77	3,36	2,96	3,30	± 0,14	9,5
22 ¹	3,36	3,60	3,31	3,02	3,06	3,27	± 0,11	7,3
23 ¹	3,24	3,11	3,12	2,71	2,76	2,99	± 0,11	7,9
24 ¹	3,20	3,24	3,59	2,91	3,00	3,19	± 0,26	8,3
25 ¹	2,50	2,62	3,08	2,71	2,81	2,75	± 0,06	7,4
	2,83	2,73	2,62	2,53	3,07			
27 ¹	2,64	3,15	2,83	2,76	3,05	2,89	± 0,09	7,2

¹) Proben erhalten in gemahlenem Zustand, vergl. Seite 8

Tabelle 8.

Nr. der Probe	Normalziffer						Mittl. Fehler arithm. Mittels	Var. Koeff. %	% Rückstand von Sieb		
	Messung					Mittelwert			%	Nr. 6	Nr. 7
	1	2	3	4	5						
1	625	750	670	660	755	692	± 26	8,3	59,25	14,75	
2	817	1080	808	815	920	888	± 52	13,2	54,52	16,00	
3	630	640	684	580	680	674	± 18	8,4	58,50	18,50	
	694	715	723	620	770						
4	910	1080	800	1052	902	949	± 52	12,2	55,50	15,50	
5	850	880	901	949	845	885	± 19	4,8	57,00	11,50	
7	700	618	624	764	802	702	± 37	11,7	56,25	14,00	
8	820	980	808	845	992	889	± 40	10,1	56,00	15,00	
9	787	844	856	792	849	827	± 15	4,0	53,25	29,75	
10	623	706	690	776	713	702	± 25	7,8	51,10	16,10	
11	820	825	841	1043	982	902	± 46	11,4	51,75	30,50	
12	888	804	790	890	940	862	± 28	7,4	60,50	13,00	
13	815	753	717	792	862	788	± 25	7,1	57,85	17,05	
14	684	673	678	752	611	680	± 22	7,4	58,85	16,85	
15	686	770	720	823	790	758	± 25	7,2	62,60	16,20	
16	801	812	781	822	735	790	± 15	4,4	60,00	17,00	
17	1110	1060	989	802	840	960	± 60	14,1	57,60	17,00	
18	745	886	756	898	842	825	± 32	8,7	62,25	17,50	
19	702	814	794	937	856	821	± 38	10,4	56,75	14,10	
20 ¹	1120	1031	1002	1014	1010	1047	± 28	8,6	45,75	21,10	
	971	1230	986	1152	954						
21 ¹	1140	830	950	1046	1024	998	± 52	11,6	41,50	27,60	
22 ¹	870	1013	960	1200	1055	1020	± 55	11,9	42,00	16,80	
23 ¹	853	706	782	871	802	803	± 29	8,1	52,50	14,50	
24 ¹	954	887	785	841	862	866	± 28	7,0	52,25	12,00	
25 ¹	970	910	1025	981	1002	978	± 19	4,4	53,50	14,75	
27 ¹	1080	920	1005	985	1035	1005	± 27	5,9	51,75	17,50	

1) Proben erhalten im gemahleneu Zustand.

2,25 erhalten, während 18,55% Rohzellulose gefunden wurden. Bei der Behandlung mit Lauge und Säure wurden sehr dunkle Lösungen erhalten, so daß alle Anzeichen darauf hinweisen, daß auch diese Probe stark verunreinigt ist. Für das übrige Material schwankt die Vergleichszahl zwischen den Werten 2,75 und 3,60 und die Normalzahl zwischen 674 bis 1047.

Zur Bewertung dieser Zahlen für die praktische Verwendbarkeit ist noch die Frage zu klären, ob die Schwankungen zufälliger Natur sind oder ob sie den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen, was man durch die Feststellung der Wahrscheinlichkeit solcher Zufälle erreichen kann. Nach R. A. FISHER¹⁵ sollte der Wahrscheinlichkeitswert kleiner als 0,01 sein, also unter 1% liegen, was auf folgende Weise berechnet wird: Es werden z. B. die Abweichungen von 10 Messungen einer Probe mit oberen Grenzwerten vom arithmetischen Mittel berechnet und dasselbe bei einer Probe mit unteren Grenzwerten durchgeführt. Die erhaltenen Werte der Abweichungen werden zum Quadrat erhoben und die Resultate summiert, wie es in folgender Formel angegeben ist:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\pm \sqrt{\frac{S}{(n_1 + 1)n_2}}}$$

M_1 bedeutet das arithmetische Mittel und n_1 die Zahl der Messungen weniger 1, für die Probe mit oberen Grenzwerten, M_2 und n_2 für die Probe mit unteren Grenzwerten. Mit S wird die Summe der Quadrate der Abweichungen bezeichnet. Es wird nunmehr die Funktion t berechnet, für welche aus der von FISHER angegebenen Tafel¹⁵ die Wahrscheinlichkeit (W) der Zufälle in den Unterschieden zwischen den Mittelwerten abgelesen werden kann. Vergleichen wir so die Vergleichszahlen der Proben 3 und 25, so berechnet sich $t = 8,74$, während t für die Normalzahl der Proben 3 u. 20 mit 11,13 berechnet wurde. In beiden Fällen ist W kleiner als 1%. Die für die Proben mit Grenzwerten beobachteten Zahlenunterschiede bestehen also tatsächlich und sind keine zufälligen Schwankungen.

Für alle Proben wurde der mittlere Fehler des arithmetischen Mittels nach der Formel

¹⁵ Statistical methods for research workers. London, II, 2, 912.

$$m = \pm \sqrt{\frac{s}{(n-1)n}}$$

sowie die Streuung nach

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{s}{n-1}}$$

bestimmt. Die gefundenen Werte wurden dann im prozentuellen Verhältnis zum arithmetischen Mittel gebracht, wobei der Variationskoeffizient nach Formel

$$z = \frac{\sigma \cdot 100}{M} \text{ berechnet wurde.}$$

Aus den in Tab. 7 und 8 zusammengestellten Werten ist ersichtlich, daß die Schwankungen in beiden Methoden ähnlich sind. Vergleicht man die Zahlenwerte der ersten mit den der zweiten Methode, so kann man zwischen diesen keinen engeren Zusammenhang bemerken, obwohl bei manchen Proben, wie z. B. Nr. 3 und Nr. 14, einer kleinen Normalzahl eine große Vergleichszahl entspricht, also eine umgekehrte Proportion vorliegt. Das Fehlen der gegenseitigen Abhängigkeit kann mit den bedeutenden Unterschieden der beiden Durchführungsarten begründet werden, wobei z. B. auf den großen Einfluß hingewiesen sei, den der Grad der Zerkleinerung ausüben kann.

Die Tabellen 7 und 8 zeigen weiter, daß alle fabrikmäßig gemahlene Proben eine in der Nähe der oberen Grenze liegende Normalzahl aufweisen, während die Vergleichszahlen zwischen den Grenzwerten zerstreut liegen, was seinerseits zugunsten der Vergleichszahl spricht, doch muß die Gewichtsmethode aus anderen bereits diskutierten Gründen als genauer betrachtet werden. Für die Praxis muß aus diesen Tatsachen gefolgert werden, daß für jede Probe beide Zahlenwerte bestimmt werden sollen. Die Dauer der Analyse wird dadurch nicht bedeutend verlängert, da die Bestimmung der Vergleichszahl sehr rasch durchgeführt werden kann, wenn eine Probe bereits vorbereitet ist.

Ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Rohzellulose und unseren Zahlen konnte nicht beobachtet werden, doch zeigt ein Vergleich der Schwankungen der Vergleichs- und Normalzahl mit den Schwankungen des Gehalts an Rohzellulose in dem zur Ver-

fügung stehenden Material (12,29% bis 16,75%), daß diese sehr ähnlich sind. Zur genaueren zahlenmäßigen Darstellung betrachten wir einen oberen und einen unteren Grenzwert und berechnen wieder die entsprechenden Abweichungen, die in Prozenten ausgedrückt werden. Man findet so für Rohzellulose 15,40%, für die Vergleichszahl 13,4% und für die Normalzahl 21,7% des Mittelwertes.

Es ist schließlich noch die Frage zu klären, ob ähnlich wie bei der chemischen Analyse auch bei der mikrostatistischen Methode durch Wahl entsprechend eingestellter Komponenten Verfälschungen hergestellt werden können, die sich dem analytischen Nachweis entziehen.

Zur Orientierung darüber wurden die charakteristischen Zahlen für folgende Proben bestimmt: Für gemahlene Schalen, für Verfälschungen der Probe Nr. 2, die, wie wir wissen, einen in den zugelassenen Grenzen befindlichen Rohzellulosegehalt hat, für Verfälschungen der Probe Nr. 3, die eine hohe Vergleichszahl und eine kleine Normalzahl besitzt und die, wie schon erwähnt, sich von den vorhandenen Proben am besten zur Bereitung einer Verfälschung eignet. Als Schalen wurden dieselben wie bei den früheren Versuchen verwendet und ihr Vermahlungsgrad bestimmt. Die Probe ging zur Gänze durch Sieb Nr. 5 und der Rückstand auf Sieb Nr. 6 betrug 60,1%, auf Sieb Nr. 7 10%. Die Resultate der Messungen sind in Tab. 9 zusammengestellt, wobei wieder fünf Messungen und in Grenzfällen zehn durchgeführt wurden.

Die Vergleichszahlen vergleichen wir mit der Grenzziffer 2,75 und die Normalzahl mit 1047. Die Vergleichszahl des Pfeffers Nr. 2 fällt auf Zusatz von 10% Schalen auf 2,23, welcher Wert ebenfalls nach der oben angegebenen Weise nach FISHER auf die Wahrscheinlichkeit eines Zufallresultates überprüft wurde. Der Wert W wurde auch hier wieder kleiner als 0,01 gefunden. Die Normalziffer erhöhte sich dagegen bei einem Zusatz von 15% Schalen auf 1189; auch für diesen Wert wurde ein Zufallsresultat durch die oben zitierte Berechnung ausgeschlossen. Aus Tab. 4 wissen wir, daß der Gehalt einer 10%igen Verfälschung an Rohzellulose 15,05% beträgt, und daß sich dieser Wert sogar bei einer 30%igen Verfälschung noch innerhalb der zugelassenen Grenzen

Tabelle 9.

Probe	Schalen- gehalt in %	Vergleichszahl					Mittel- wert	Normal- zahl					Mittel- wert
		0,30	0,44	0,35	0,38	0,40		0,37	3060	3408	3340	3084	
Schalen													
Pfeffer Nr. 2	10	2,32	2,46	2,39	2,28	2,11	2,23	1140	963	1210	1146	972	1086
		2,15	2,01	2,24	2,02	2,29							
"	15	1,92	2,33	2,10	2,07	2,25	2,13	1323	1002	1302	1282	1095	1189
								1202	1180	1356	1130	1016	
"	20	1,96	1,64	1,51	1,83	1,63	1,71	1248	1133	1450	1260	1122	1243
"	30	1,28	1,25	1,45	1,10	1,48	1,31	1620	1365	1435	1610	1482	1502
Nr. 3	10	2,65	2,95	2,74	2,80	2,75	2,78	1008	941	815	1000	917	936
"	15	2,60	2,42	2,38	2,61	2,41	2,45	1007	1125	1059	1047	1060	1060
		2,40	2,56	2,57	2,08	2,50							
"	20	2,14	2,00	2,22	2,37	2,05	2,16	1335	1170	1200	1248	1025	1187
								1122	1435	1122	1125	1086	
"	30	1,42	1,73	1,85	1,37	1,93	1,66	1387	1504	1160	1276	1431	1352

befindet. Es leistet also in dem Falle der Probe Nr. 2 die mikrostatistische Methode viel bessere Dienste als die chemischen Verfahren. Was die Probe Nr. 3 anbelangt, die bekanntlich eine spezielle Stellung einnimmt, so zeigt sich auch für derartige Proben die vorliegende Methode als durchaus brauchbar.

Die mit unserem Material zusammengestellten Verfälschungen können im ungünstigsten Fall schon bei einer 15%igen Schalenbeimengung nachgewiesen werden. Überlegt man, daß die entsprechenden Werte für Schalen nach der vorliegenden Methode 0,37 und 3142 sind und daß diese Werte von dem des reinen Pfefferpulvers viel weiter abliegen, als die Spannung zwischen dem Rohzellulosewert für Schalen und Pfeffer beträgt, so wird das oben dargestellte Ergebnis leicht verständlich.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß es noch nicht möglich war, sämtliche Sorten von schwarzem Pfeffer zu untersuchen. Unter dem von uns geprüften Material befanden sich aber

die wichtigsten Sorten, die nach Europa eingeführt werden, so daß schon jetzt gewisse Schlüsse gezogen werden können.

Aus den von uns gefundenen Resultaten muß demnach für die Praxis der Schluß gezogen werden, daß ein auf den normalisierten Vermahlungsgrad gebrachtes schwarzes Pfefferpulver als mit Schalen verfälscht anzusehen ist, wenn der aus fünf Messungen erhaltene Mittelwert der Vergleichszahl kleiner als 2,75 und der ebenfalls aus fünf Messungen erhaltene Mittelwert der Normalzahl größer als 1047 ist.

Der größte Teil der Arbeit wurde am botanischen und pharmakognostischen Institut der Universität Lwów und am Warenkundlichen Institut der Handelshochschule Lwów durchgeführt.