

Nachweis und Bestimmung von Ameisensäure in Fleisch-extrakten.

Von

Ernst Waser (Zürich).

Mit einer Kurvenzeichnung.

Der Redaktion zugegangen am 31. Dezember 1916.

Vor kurzem veröffentlichte F. Adam ¹⁾ aus der k. k. allgemeinen Untersuchungsanstalt für Lebensmittel in Wien eine Arbeit über die Ameisensäure als Bestandteil von Suppenwürzen und -würfeln. ²⁾ Dies gibt mir Veranlassung, auf Versuche zurückzukommen, die ich vor längerer Zeit über das nämliche Thema angestellt habe, die ich aber nicht publizieren wollte, weil sie mir zu wenig allgemeines Interesse zu bieten schienen.

Der Gehalt der fertigen Produkte an Ameisensäure schwankt innerhalb gewisser Grenzen, die jedenfalls in enger Beziehung zum Stärkegehalt der verwendeten Ausgangsstoffe stehen. Es ist zwar möglich, daß sich die Ameisensäure nebenbei auch aus andern Substanzen bildet; Brasch und Neuberg ³⁾ haben sie in großen Mengen beim Faulen von Glutaminsäurelösungen erhalten und ich halte es auch nicht für ausgeschlossen, daß aus dem Eiweiß selbst Ameisensäure abgespalten werden kann.

Die von F. Adam (loc. cit.) angegebenen Werte für Ameisensäure stimmen ziemlich gut mit den meinigen überein, so daß ich auf die Wiedergabe meiner Untersuchungen, so weit sie auf dem auch von Adam bearbeiteten Gebiete liegen, hier wohl verzichten kann. Ich beschränkte mich jedoch nicht auf den Nachweis und die quantitative Bestimmung der Ameisensäure in Produkten pflanzlichen Ursprunges, sondern

¹⁾ F. Adam, Archiv für Chemie und Mikroskopie, 1916, Heft 3.

²⁾ Unter «Suppenwürfel» sind in Österreich die unter der Bezeichnung «Rindssuppewürfel» im Handel befindlichen Fleischbrühwürfel gemeint.

³⁾ Brasch und Neuberg, Biochemische Zeitschrift, Bd. 13, S. 303 (1908).

ich bezog auch Fleisch, Fleischbrühe und Fleischextrakte in die Reihe meiner Versuche ein. Dabei stieß ich auf recht interessante Tatsachen, die ich nun doch veröffentlichen möchte.

Unterwirft man einen Fleischextrakt irgendwelcher Herkunft unter Zusatz von Phosphorsäure oder Weinsäure der Wasserdampfdestillation, so zeigt das Destillat nach vorausgegangener Reduktion mit Magnesium und Salzsäure eine oft sehr intensive Reaktion auf Formaldehyd. Da diese Reaktion mit nicht reduziertem Destillat ausbleibt, so ist damit der Nachweis des Vorhandenseins von Ameisensäure mit Sicherheit erbracht. Nachdem ich mich überzeugt hatte, daß dieser merkwürdige Befund nicht zufällig war, sondern in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße bei allen mir erreichbaren Fleischextraktarten erhalten wurde, ging ich daran, über die Mengenverhältnisse zwischen Ameisensäure und Fleischextrakt genaueren Aufschluß zu suchen.

Nach zahlreichen Vorversuchen, in die auch titrimetrische Methoden einbezogen wurden, hatte ich schon bei der Untersuchung der vegetabilischen Produkte als weitaus besten und einfachsten Weg zur quantitativen Bestimmung der Ameisensäure ein Verfahren erkannt und gewählt, das namentlich von H. Fincke¹⁾ in einer schönen Studie auf das exakteste ausgearbeitet worden ist. Es beruht auf der Reduktion von Sublimat zu Kalomel, die mit Hilfe der Ameisensäure zustande kommt, und die durch geeignete Bedingungen quantitativ gestaltet wird. Diese Methode, die ich hier wieder mit Erfolg benützte, ist auch von F. Adam angewendet worden. Ich kann auf eine nähere Beschreibung derselben umsomehr verzichten, als sich alle Einzelheiten mit jeder wünschbaren Genauigkeit in der eben erwähnten Arbeit von H. Fincke nachlesen lassen. Das Verfahren bietet den Hauptvorteil, daß die Ameisensäure trotz gleichzeitiger Anwesenheit von Lävulinsäure bestimmt werden kann. Diese Säure, die im Fleischextrakt allerdings noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden ist, kommt in den Hydrolysen-

¹⁾ H. Fincke, Biochemische Zeitschrift, Bd. 51, S. 253 (1913).

produkten aus pflanzlichen Stoffen in nachweisbarer Menge vor. Da das Doppelsalz von Lävulinsäure und Quecksilberchlorid in Wasser sehr schwer löslich ist, könnte es bei der Bestimmung des Kalomels leicht mitgewogen werden. Sorgt man aber für genügenden Zusatz von Salzsäure, in der das Doppelsalz leicht löslich ist, so kann diese Fehlerquelle gut vermieden werden.

Gewöhnlich wog ich für eine Bestimmung 10—20 g Fleischextrakt ab, löste in 100 ccm Wasser und setzte für jedes Gramm Fleischextrakt 3 ccm 6%ige Phosphorsäure zu. Diese Lösung wurde der Wasserdampfdestillation unterworfen, wobei darauf geachtet wurde, daß das Volumen der Extraktlösung stets gleich blieb. Im allgemeinen wurden 1500 ccm Destillat aufgefangen. 200 ccm davon wurden nach kurzem Aufkochen mit $\frac{n}{10}$ -NaOH unter Phenolphthaleinzusatz zur Bestimmung der flüchtigen Säuren titriert. Die übrigen 1300 ccm wurden zur quantitativen Bestimmung der Ameisensäure mittels der Sublimatmethode verwandt. Da die Ameisensäure mit Wasserdämpfen relativ schwer flüchtig ist (s. Fincke, loc. cit.), so überzeugte ich mich durch mehrfache Versuche, ob bei verlängerter Wasserdampfdestillation noch nennenswerte Mengen dieser Säure mitgerissen werden. Dies war nicht der Fall, denn die in weiteren 1500 ccm Destillat gefundene Menge Ameisensäure war so gering, daß sie höchstens zur Aufrundung der im ersten Destillat bestimmten Menge dienen könnte. Ein Beispiel möge dies kurz darlegen:

Abgewogen 13,5769 g Fleischextrakt F. I; gelöst in 100 ccm Wasser + 40 ccm 6%ige Phosphorsäure: Wasserdampfdestillation:

Erstes Destillat: 1500 ccm. Die davon verwendeten 1300 ccm mit Sublimat behandelt ergaben 0,0989 g Kalomel, entsprechend 0,0819 g Ameisensäure in 100 g Extrakt.

Zweites Destillat: 1500 ccm. 1300 ccm davon ergaben nur 0,0106 g Kalomel, entspr. 0,0088 g Ameisensäure in 100 g Extrakt.

Noch war die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß die im Fleischextrakt enthaltenen Kohlenhydrate wie Glykogen,

Glykose und Inosit, oder auch die Milchsäure unter dem Einflusse der Mineralsäure Ameisensäure abspalten könnten. Wie ich weiterhin darlegen werde, ist dies unter den gewählten Bedingungen nicht der Fall; immerhin stellte ich auch einige Destillationsversuche an, bei denen die zum Ansäuern verwendete Phosphorsäure durch Weinsäure ersetzt wurde.

Z. B.: Abgewogen 12,9008 g Fleischextrakt F. I.; zusammen mit 3,0 g Weinsäure gelöst in 150 ccm Wasser: Wasserdampfdestillation:

Erstes Destillat: 1500 ccm; 1300 ccm davon ergaben 0,0692 g Kalomel, entspr. 0,0603 g Ameisensäure in 100 g Fleischextrakt.

Zweites Destillat: 1500 ccm; 1300 ccm davon ergaben 0,0099 g Kalomel, entspr. 0,0086 g Ameisensäure in 100 g Fleischextrakt.

Der Versuch ergab also etwas weniger Ameisensäuregehalt des gleichen Extraktes, als dem Mittel aus verschiedenen Bestimmungen mit Phosphorsäure entsprach. Das Manko ist aber recht klein und es läßt sich außerdem zwanglos dadurch erklären, daß infolge der viel geringeren Acidität die Ameisensäure noch schwerer als sonst aus der wässerigen Lösung auszutreiben ist.

Um die Frage nach der Herkunft der Ameisensäure im Fleischextrakt wenigstens vorläufig zu entscheiden, unternahm ich die folgenden Versuche:

1. Eine kleine Probe Glykogen wurde mit Magnesium und Salzsäure behandelt und das Filtrat mit frischer Milch und eisenchloridhaltiger Salzsäure vergeblich auf Formaldehyd geprüft.

Nun wurde 1,0 g Glykogen mit 500 ccm destilliertem Wasser während 2 Stunden bei 70° digeriert, im Vakuum eingedampft und die nunmehr sehr konzentrierte Lösung nach Zusatz von 30 ccm 6%iger Phosphorsäure der Wasserdampfdestillation unterworfen. Die Folge der Operationen und auch die Konzentration entsprachen ziemlich genau dem Vorgehen bei der Herstellung des Fleischextraktes. Das Destillat wurde wie gewöhnlich mit Sublimat behandelt, es zeigte

aber nicht die geringste Reduktionswirkung, so daß die Annahme der Entstehung der Ameisensäure aus dem Muskelglykogen sehr wenig Wahrscheinlichkeit besitzt.

2. 1,0 g Inosit wurde den gleichen Operationen, wie ich sie soeben schilderte, unterworfen, allein auch hier wurde keine Spur von Ameisensäure gefunden.

3. Bei der Behandlung des Destillates von 10 g Traubenzucker mit Sublimat entstand wenigstens eine merkliche Trübung, das entstandene Kalomel lohnte aber eine Wägung nicht.

4. 10 g Milchsäure wurden wie beim Glykogen angegeben behandelt, aber auch hier ergaben sich nicht die geringsten Anhaltspunkte für eine Entstehungsmöglichkeit der Ameisensäure.

Nimmt man an, daß diese 4 Substanzen die am meisten in Betracht fallenden, wenn nicht die einzigen Ameisensäurebildner des Muskelfleisches sind, so resultiert aus diesen Versuchen, daß die Ameisensäure nicht erst bei der Herstellung des Fleischextraktes entsteht, sondern daß sie im Muskelfleisch vorgebildet ist und als solche in den Extrakt übergeht. Bevor ich dies weiter begründe, möchte ich die Resultate meiner ersten Untersuchungen mitteilen.

Es standen mir 7 verschiedene Fleischextraktarten zur Verfügung.

1. und 2. Muster von aus dem Großhandel entnommener Ware ohne Markenbezeichnung (abgekürzt F. I und F. II).

3. und 4. Muster von aus dem Großhandel entnommener Ware ohne Markenbezeichnung (abgekürzt G. I und G. II).

5. Originaltöpfchen von Liebigs Fleischextrakt (abgekürzt L. Orig.)

6. Originaltöpfchen von Armour's Fleischextrakt (abgekürzt A. Orig.).

7. Muster eines Fleischextraktes, der im Jahre 1914 nach der Vorschrift von J. von Liebig aus dem frischen Muskelfleisch eines ganzen Ochsen hergestellt worden war (abgekürzt E).

Mit diesen Extrakten wurden die folgenden in Tabellenform zusammengestellten Bestimmungen ausgeführt:

Tabella I.

Fleisch- extrakt	Zur Bestimmung angewandt in g	Bestimmung der 200 ccm Wasser- dampfdestillat ver- brauchten n/10-NaOH in ccm	flüchtigen Säuren als Ameisensäure berechnet, bezogen auf 100 g Extrakt in g	Quantitative Bestimmung der Ameisensäure 1300 ccm Wasserdampf- destillat ergabene Kalometel		Bestimmung der gefundenen Menge Ameisensäure bezogen auf 100 g Extrakt in g
				in g	in g	
F. I	13,5742	2,58	0,656	0,1006	0,0113	0,083
,	14,7937	3,71	0,865	0,1122	0,0126	0,085
,	13,5769	2,92	0,742	0,0989	0,0111	0,082
F. II	15,0539	2,55	0,585	0,0839	0,0094	0,063
,	12,5869	2,74	0,751	0,0828	0,0093	0,074
G. I	14,0340	3,09	0,760	0,1228	0,0138	0,098
,	13,6634	3,02	0,763	0,1147	0,0129	0,094
G. II	10,4910	2,50	0,822	0,0575	0,0065	0,062
,	10,7153	2,72	0,876	0,0568	0,0064	0,060
L. Orig.	6,2512	2,37	1,308	0,0708	0,0079	0,127
A. Orig.	10,4073	2,82	0,935	0,0963	0,0108	0,104
F.	21,3422	15,75	2,547	0,8851	0,0996	0,467
,	23,4744	17,35	2,550	0,9971	0,1122	0,478

Eine Diskussion der Mengenverhältnisse der in den Extrakten vorhandenen flüchtigen Säuren scheint mir nicht besonders ersprießlich zu sein, da die Werte bei an sich ähnlichen Extrakten ziemlich schwankend sind. Dies hängt natürlich mit der ganzen Art der Titration zusammen, die in der Siedehitze vorgenommen werden muß, um den störenden Einfluß der gelösten Kohlensäure zu vermeiden; beim Kochen geht dann eben auch ein gewisser Anteil der flüchtigen Säuren verloren. Auch die Berechnung der flüchtigen Säuren als Ameisensäure hat den Nachteil, daß sie nicht die wahre Menge der flüchtigen Säuren anzeigt, sondern nur einen Minimalwert. Die Titration wurde überhaupt nur unternommen, um Anhaltspunkte über die Menge des dem übrigen Destillat zuzusetzenden Quantum Sublimatlösung zu gewinnen.

Unterzieht man aber die in 100 g Fleischextrakt gefundenen Ameisensäuremengen (letzte Kolonne der Tabelle) einer näheren Betrachtung, so fällt ohne weiteres eine weitgehende Ähnlichkeit der Zahlen der käuflichen Extrakte F. I und II, G. I und II, L. Orig. und A. Orig. auf. Diese Zahlen bewegen sich zwischen den ungefähren Grenzen von 0,06 bis 0,10%, im Mittel 0,08%. Vergleicht man damit den Ameisensäuregehalt des aus frischem Muskelfleisch vom Ochsen gewonnenen Extraktes E., so findet man, daß dieser Extrakt rund 5—6 mal mehr Ameisensäure enthält, als die eben erwähnten Produkte. Diese Tatsache kam mir so unerwartet und merkwürdig vor, daß ich zu ihrer Aufklärung noch eine ganze Reihe weiterer Versuche unternahm.

Die nächstliegende Fragestellung war die, ob sich auch im frischen Fleisch und in der *lege artis* bereiteten Fleischbrühe Ameisensäure nachweisen lasse. Für frisches Fleisch ist dies schon seit längerer Zeit bekannt, da die Ameisensäure als normales Zwischenprodukt des tierischen Stoffwechsels aufgefunden wurde, und sogar als Endprodukt im Harn erscheint.¹⁾ Es fiel mir denn auch nicht schwer, mit Hilfe der Reaktion mit frischer Milch und eisenchloridhaltiger

¹⁾ Siehe z. B. Steppuhn und Schellbach, Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 274 (1912), woselbst sich auch weitere Literaturangaben finden.

Salzsäure nach vorausgegangener Reduktion den aus der Ameisensäure entstandenen Formaldehyd nachzuweisen.

Selbstverständlich überzeugte ich mich immer zuerst durch Kontrollversuche, daß das zur Reaktion verwendete Material selbst formaldehydfrei war, ebenso wie auch die eigentliche Reaktion mit allen Kautelen vorgenommen wurde.¹⁾ Dabei fiel mir auf, daß länger gelagertes Fleisch eine merklich stärkere Reaktion ergab als ganz frisches Fleisch. Wurde frisches Fleisch mit der gleichen Menge Wasser unter Toluolabschluß im Brutschrank aufbewahrt, so blieb die Reaktion während langer Zeit ungefähr gleich schwach; sie wurde erst nach ungefähr 3 Wochen etwas stärker. Ließ man dagegen frisches Fleisch unter loser Bedeckung im Freien bis zum Faulen stehen, so zeigte sich schon nach wenigen Tagen eine sehr deutliche Intensitätszunahme der Farbreaktion auf Formaldehyd. Dies führte mich dann zu den weiterhin zu besprechenden Versuchen mit selbst hergestellten Fleischextrakten.

Auch in der Fleischbrühe ist Ameisensäure leicht nachzuweisen und das einzig erstaunliche dabei ist nur, daß sie nicht schon früher gefunden wurde.

1000 g 12 Stunden altes, von Fett und Sehnen befreites, feingehacktes Ochsenfleisch (*M. glutaei*) wurde in 3 Liter siedendes Quellwasser gegeben und 1½ Stunden in gelindem Sieden erhalten. Dann wurde das Fleisch abgenutscht und ausgepreßt, die erhaltene klare Fleischbrühe (im ganzen 2220 ccm) über Nacht stehen gelassen und in 2 Portionen aufgearbeitet. Die eine Hälfte der Brühe wurde mit 100 ccm $\frac{2}{n}$ -Phosphorsäure versetzt und in einem geräumigen Kolben auf ca. 200 ccm eingeeengt. Das Destillat enthielt 0,03 g flüchtige Säuren (als Ameisensäure berechnet), gab aber nach 2stündigem Behandeln mit Sublimat im Dampfbad eine nur eben bemerkbare Trübung von Kalomel. Die konzentrierte Fleischbrühe wurde nun der Wasserdampfdestillation unterworfen und 1500 ccm Destillat aufgefangen. 200 ccm davon verbrauchten 6,85 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH;

¹⁾ Siehe z. B. Fincke, l. c., S. 258; Kaiserl. Gesundheitsamt: Entwürfe zu Festsetzungen über Lebensmittel: Essig und Essigessenz, Heft 3. S. 16, Berlin 1912.

dies entspricht 0,473 g flüchtigen Säuren (als Ameisensäure berechnet) in 1 kg Fleisch. Die übrigen 1300 ccm Destillat ergaben nach der Behandlung mit Sublimat 0,1539 g Kalomel: dies entspricht 0,035 g Ameisensäure in 1 kg Fleisch oder 2,22 l Fleischbrühe. Rechnet man diese Zahl auf Fleischextrakt um, indem man mit J. von Liebig annimmt, daß 100 kg mageres Fleisch eine Ausbeute von 3 kg Extrakt geben,¹⁾ so bekäme man aus 1 kg Fleisch rund 30 g Extrakt, in denen also 0,035 g Ameisensäure enthalten wären. Auf 100 g Extrakt würde dies 0,117 g Ameisensäure ausmachen. Würde man dieser Berechnung eine höhere Extraktausbeute zugrunde legen, wie dies ja wahrscheinlich der Fall ist, so würde natürlich der Ameisensäurewert entsprechend geringer.

Die zweite Hälfte der gleichen Fleischbrühe wurde erst nach 4tägigem Stehen aufgearbeitet. Das längere Stehen hatte eine Abnahme sowohl des Gehaltes an flüchtigen Säuren wie auch an Ameisensäure bewirkt. 200 ccm Wasserdampfdestillat verbrauchten nur noch 2,30 ccm n_{10} -NaOH, entsprechend 0,164 g flüchtigen Säuren (als Ameisensäure berechnet) in 1 kg Fleisch. Das übrige Destillat ergab 0,0276 g Kalomel, entsprechend 0,0064 g Ameisensäure aus 1 kg Fleisch, oder wie oben berechnet, 0,021 g in 100 g Extrakt.

Des weiteren stellte ich mir auf verschiedene Weise die folgenden 4 Fleischextrakte selbst her. Zur Verwendung kam dabei das fett- und sehnenfreie, durch den Fleischwolf getriebene Ochsenfleisch vom gleichen Stück, das zur Bereitung der Fleischbrühe gedient hatte.

A. 1000 g 12 Stunden altes Fleisch wurden mit 2 l Quellwasser übergossen, langsam erwärmt und 1 Stunde bei 70° digeriert. Dann wurde das Fleisch gut ausgepreßt und das Filtrat nach kurzem Aufkochen nochmals filtriert. Die klare Lösung wurde nun im Vakuum, bei einer Badtemperatur von höchstens 60—70° bis zur Konsistenz eines etwas dünnen Fleischextraktes eingedampft; das zum Schluß sehr starke

¹⁾ In den «Neuen Untersuchungen über Fleischextrakt», Lebbin, Berlin 1915, wird gezeigt, daß diese Angaben nicht mehr zutreffen, da die Ausbeuten wesentlich höher sind.

Schäumen verhinderte ein weiteres Eindampfen bis zur gewünschten Extraktstärke. Der erhaltene Extrakt wurde gleichwohl zu den Untersuchungen verwendet; um aber vergleichbare Zahlen zu erhalten, wurde außerdem der Wassergehalt bestimmt.

B. 500 g Fleisch wurden mit 500 ccm destilliertem Wasser und 25 ccm Toluol in den Brutschrank gestellt. Es wurde 7 Tage bei einer Temperatur von 35–40° stehen gelassen und das Toluol nach Bedarf ergänzt. Der Fleischbrei hatte nach dieser Zeit eine leicht graue Farbe angenommen, Geruch und Aussehen waren aber sonst einwandfrei. Es wurden dann noch 500 ccm Wasser zugegeben und 2 Stunden bei 70° digeriert, abgeseiht, das Filtrat aufgekocht, nochmals filtriert und bei 60–70° Badtemperatur im luftverdünnten Raume auf ein möglichst kleines Volumen gebracht. Auch hier wurde der Gehalt an Trockensubstanz bestimmt.

C. 500 g Fleisch wurden mit 500 ccm 1/2%iger Salzsäure übergossen, gut durchgeschüttelt und in einem geräumigen Erlenmeyer-Kolben unter losem Watteverschluß im Freien stehen gelassen. Nach 7 tägigem Stehen wurde das Fleisch verarbeitet. Es bildete eine gallertige, durchgehend grau verfärbte, schimmelige Masse, von unangenehmem, saurem Geruch. Nach Zugabe von 1 l Wasser wurde es 2 Stunden bei 70° digeriert, nach genauer Neutralisation mit verdünnter Natronlauge filtriert, das Filtrat aufgekocht, nochmals filtriert und im Vakuum eingedampft.

D. 500 g Fleisch wurden in einer mit Uhrglas bedeckten Porzellanschale im Freien sich selbst überlassen. Nach 7 Tagen war es äußerlich grau verfärbt, innerlich von frischer Rosa-farbe, leicht schmierig und von sehr starkem, fauligem Geruch. Es wurde mit 1 l Wasser bei 70° digeriert und wie die übrigen Proben auf Extrakt verarbeitet.

Von diesen 4 Extrakten wurden nun gewogene Mengen einerseits zur Wasserdampfdestillation wie bisher, andererseits zur Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes durch 4 stündiges Trocknen bei 100–105° verwendet. Die folgende Tabelle II gibt über die zutage geförderten Zahlen nähere Auskunft.

Tabelle II.

Fleisch- extrakt	Trocken- substanz in %	Zur Bestim- mung ange- wandte Menge in g	Bestimmung der flüchtigen Säuren		Quantitative Bestimmung der Ameisensäure			
			200 ccm Destillat ver- brauchten n/10-NaOH in ccm	bezogen auf 100 g Trockensub- stanz (als Ameisen- säure berechnet) in g	1300ccm Destillat ergaben Kalomel in g	gefundene Menge Ameisen- säure in der Probe in g	bezogen auf 100 g frischen Extrakt in g	bezogen auf 100 g Trocken- substanz in g
A. (rein)	28,00	50,00	16,10	3,969	0,5047	0,0568	0,1178	0,421
B. (Toluol)	76,26	6,5575	13,80	9,524	0,2307	0,0260	0,3958	0,519
C. (HCl 1/2 %)	37,05	18,3899	2,28	1,155	0,0419	0,0047	0,0256	0,069
D. (gefault)	78,32	6,5708	4,70	3,152	0,5064	0,0570	0,8670	1,107

Auch wenn man berücksichtigt, daß hier im Vergleich zur Großfabrikation nur sehr kleine Mengen Fleisch verarbeitet wurden und daß die gefundenen Zahlen bei Verarbeitung größerer Fleischmengen an Genauigkeit und Durchschnittsgültigkeit noch erheblich gewonnen hätten, so bleiben dennoch zwischen den einzelnen Werten Unterschiede bestehen, die weit über die Größenordnung aller Versuchsfehler hinausgehen. Es zeigt sich bei dem Extrakt aus Fleisch, das in sehr verdünnt salzsaurer Lösung gelegen hatte, eine frappante Ähnlichkeit mit dem durchschnittlichen Ameisensäuregehalt der in Tabelle I aufgeführten käuflichen Extrakte. Andererseits bringen die Versuche mit Extrakt aus ganz frischem Fleisch und solchem, das längere Zeit unter Toluolabschluß gestanden hatte, eine Bestätigung der in der ersten Versuchsreihe gefundenen hohen Ameisensäurezahl des aus dem frischen Fleisch eines ganzen Ochsen bereiteten Extraktes. Der geradezu abnorm hohe Ameisensäuregehalt des Extraktes aus gefaultem Fleisch fällt dagegen ganz aus dem Rahmen des bisher gewohnten.

In der III. Tabelle sollen die ermittelten Ameisensäurewerte aus den beiden Versuchsreihen, der besseren Übersichtlichkeit halber, nochmals zusammengestellt werden. Damit sie vergleichbar werden, sind auch die Zahlen der ersten Tabelle

Tabelle III.

Fleischextrakt	flüchtige Säuren in 100 g Trockensubstanz	Ameisensäure in 100 g Trockensubstanz
Extrakte F. I und II, G. I und II, L. und A. Orig. im Mittel	1,03	0,11
Extrakt E.	3,20	0,59
Extrakt A. (aus frischem Fleisch)	3,97	0,42
Extrakt B. (Toluolfleisch)	9,52	0,52
Extrakt C. (Salzsäurefleisch)	1,16	0,07
Extrakt D. (gefaultes Fleisch)	3,61	1,11
Fleischbrühe (frisch)	—	0,14
Fleischbrühe (4 Tage alt)	—	0,03

auf 100 g trockenen Extrakt umgerechnet worden, wobei angenommen wurde, daß die dort aufgeführten Extrakte durchschnittlich 20% Wasser enthalten.

Wie ich schon oben zeigte, ist es ganz unwahrscheinlich, daß sich die Ameisensäure erst bei der Herstellung des Fleischextraktes bildet, man müßte sie sonst auch aus den hauptsächlich in Betracht fallenden und unter den gleichen Bedingungen behandelten Substanzen wie Glykogen, Inosit usw. in faßbaren Mengen erhalten, was durchaus nicht der Fall ist. Die im Extrakt enthaltene Ameisensäure stammt also aus dem Muskelfleisch selbst, in dem sie vorgebildet und dessen **normaler** Bestandteil sie ist. Bei Produkten, die durch Hydrolyse von pflanzlichem Eiweiß entstehen, liegen die Verhältnisse insofern anders, als die Ameisensäure nicht als solche im Ausgangsmaterial vorhanden ist, sondern erst durch den Prozeß der Hydrolyse aus den beigemengten Kohlenhydraten und eventuell aus dem Eiweiß selbst gebildet und dann auch in die Endprodukte übernommen wird. So bildet hier der **Stärkegehalt** einen ungefähren Maßstab für die unter gleichen Entstehungsbedingungen zu erwartenden **Ameisensäuremengen**. Wenn demnach Fleischextrakte derartig große Differenzen im Ameisensäuregehalt aufweisen, wie sie in Ta-

belle III zum Ausdruck kommen, so kann die Ursache davon eben nur in der Beschaffenheit des zur Verwendung gelangten Fleisches bzw. in den Herstellungsverfahren liegen. Die zunächst augenscheinlich schwer von einem gemeinsamen Gesichtspunkt aus zu würdigenden Befunde gewinnen nämlich Gestalt, wenn man die von Lebbin¹⁾ mitgeteilten Versuchsergebnisse berücksichtigt. Man muß demnach zu der Auffassung gelangen, daß bei der Autolyse mehr oder minder große Mengen von Ameisensäure sich bilden, wahrscheinlich gleichzeitig und parallel mit der Milchsäure. Bei Unterdrückung der bakteriellen und fermentativen Prozesse durch Salzsäure wird dagegen die Ameisensäurebildung auf rein hydrolytische Prozesse beschränkt. Demgemäß sind die Extrakte des Handels, die nach Lebbins Feststellungen unter Anwendung von Salzsäure als konservierendes und die Hydrolyse beförderndes Mittel hergestellt werden, außerordentlich arm an Ameisensäure, gegenüber den Extrakten, welche ich aus ganz frischem und aus gefaultem Fleisch gewonnen habe. Lebbin hat leider quantitative Angaben über die flüchtigen Säuren im Fleischextrakt nicht gemacht, sondern beschränkt sich (S. 12 l. c.) lediglich auf die Angaben, daß manche Fleischextrakte ein saures Destillat, einige wenige ein alkalisches ergeben, während er neutrale Destillate überhaupt nicht erhalten hat.

Schließlich noch einige Worte über die Zulässigkeit der Ameisensäure in Nahrungsmitteln. F. Adam befürchtet, daß die Ameisensäure ein schädlicher Bestandteil der Rindssuppewürfel und deshalb aus diesen Produkten zu entfernen sei. Ich kann mich dieser Ansicht nicht anschließen, denn einmal gelangt die Ameisensäure in den Rindssuppewürfeln oder im Fleischextrakt nicht als freie Säure, sondern als Salz in den Verdauungstraktus und andererseits sind die auf einmal zugeführten Dosen so gering,²⁾ daß man eine toxische Wirkung sicherlich nicht zu erwarten hat. Die Durchsicht der Literatur der letzten 15 Jahre über die physiologische Wirkung der

¹⁾ «Neue Untersuchungen über Fleischextrakt», Berlin 1915.

²⁾ Rechnet man 3,5 g Fleischextrakt auf einen Teller Suppe, so beträgt die damit eingeführte Dosis Ameisensäure ca. 0,015 g.

Ameisensäure ergibt fast übereinstimmend, daß die toxische Dosis sehr hoch liegt¹⁾ und daß die ameisensauren Salze unschädliche Diuretika sind.²⁾ C. Fleig¹⁾ weist nach, daß sich die per os eingeführten Formiate zu einem großen Teil schon im Darm zersetzen, daß sie in kleinen Mengen keinen Einfluß auf die Verdauungsvorgänge ausüben, in größeren Mengen die Sekretionstätigkeit und die Darmperistaltik erhöhen, daß sie aber, abgesehen von der Diurese, keine sonstige Wirkung zeigen. E. Clément³⁾ und L. Garrigue,⁴⁾ der letztere auch nach Selbstversuchen, sagen sogar, daß die Formiate nach intravenöser Injektion die Muskelkraft stärken, die Widerstandskraft gegen Ermüdung erhöhen und auch den Appetit günstig beeinflussen. G. Lebbin,⁵⁾ der die Ameisensäure in Himbeeren bestimmte, ließ mehrere Versuchspersonen während einiger Wochen täglich 0,5 g freie Ameisensäure in Himbeerlimonade einnehmen, ohne daß er die geringste schädliche Wirkung (z. B. Harneiweiß) wahrnehmen konnte. Endlich beweist eine über ein halbes Jahrhundert sich erstreckende Erfahrung, daß der Genuß von Fleischextrakt, der, wie ich gezeigt habe, nennenswerte Mengen von Ameisensäure enthält, noch niemandem geschadet hat.

Der Zusatz von konservierenden Stoffen zu Nahrungsmitteln ist, schon aus allgemeinen Gründen, mit Recht durchaus eingeschränkt worden. Substanzen aber, von welchen wir wissen, daß sie normalerweise im Muskelfleisch vorkommen, wie z. B. die Ameisensäure, brauchen wir aus den Suppenwürfeln nicht zu eliminieren, sofern diese Substanzen physiologische Mengen nicht übersteigen.

Im allgemeinen kann man aus dem Gesagten folgende Schlüsse ziehen:

¹⁾ C. Fleig, C. 1908, I, S. 1846. Für den Hund ist die toxische Dosis von Natriumformiat bei intravenöser Injektion 3 g pro Kilo Körpergewicht, und 4 g per os. Für das Kaninchen ist die Toxizität noch geringer.

²⁾ S. Fränkel, Arzneimittelsynthese, 1912, S. 721 u. 723.

³⁾ E. Clément, C. 1904, I, S. 1365.

⁴⁾ L. Garrigue, C. 1904, I, S. 1451.

⁵⁾ G. Lebbin, Chem. Ztg., Bd. 30, S. 1009 (1906).

Der normale Ameisensäuregehalt eines Fleischextraktes aus frischem und sterilem Fleisch beträgt ungefähr $\frac{1}{2}\%$ (Extrakte E., A. und B). Dieser Gehalt kann bis auf 0,07% sinken bei Extrakten aus Fleisch, das in Berührung mit Salzsäure gelagert hatte. Der Ameisensäuregehalt steigt bedeutend über das Normale, wenn der Extrakt aus gefaultem Fleisch gewonnen worden war.

Anhang.

Notiz über den Nachweis von Formaldehyd mit Milch und eisenchloridhaltiger Salzsäure.

Diese von Hehner¹⁾ vorgeschlagene Reaktion wurde ursprünglich zum Nachweis von Formaldehyd in Milch so ausgeführt, daß man die zu untersuchende Milch mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtete, wobei an der Berührungsstelle ein blauer Ring auftrat. Sie trat nur ein, wenn die Schwefelsäure eisenhaltig war. Die Reaktion wurde von einer ganzen Reihe von Autoren angewendet und untersucht, von denen ich nur einige neuere anführen will.

O. Rosenheim²⁾ gibt an, daß die Reaktion nur eintritt, wenn die Menge des vorhandenen Formaldehyds im Verhältnis zum Oxydationsmittel innerhalb einer gewissen Grenze bleibt. A. S. Shrewsbury³⁾ schlägt zur genaueren Bestimmung der vorhandenen Menge Formaldehyd Vergleichslösungen vor, die 2, 4, 6 und 8 Teile Formaldehyd auf 1 Million Teile Milch enthalten sollen. Nach F. W. Richardson⁴⁾ beträgt die Empfindlichkeitsgrenze der Reaktion 1:10⁶. W. H. Low⁵⁾ warnt davor, die Anwesenheit von Formaldehyd als erwiesen anzusehen, wenn nur das entstehende Gerinnsel gefärbt, die Lösung selbst nur bräunlich gefärbt erscheint. F. v. Filliger⁶⁾ sagt, daß zu konzentrierte Form-

¹⁾ The Analyst, Bd. 21, S. 94 (1896), C. 1896, I, S. 1145.

²⁾ The Analyst, Bd. 32, S. 106 (1907), C. 1907, II, S. 1809.

³⁾ The Analyst, Bd. 32, S. 5 (1907), C. 1907, I, S. 706.

⁴⁾ Journ. Soc. Chem. Ind., Bd. 26, S. 3 (1907), C. 1907, I, S. 845.

⁵⁾ Journ. Americ. Chem. Soc., Bd. 29, S. 786 (1907), C. 1907, II, S. 746.

⁶⁾ Z. Unters. d. Nahrungs- und Genußm., Bd. 16, S. 226 (1908).
C. 1908, II, S. 1127.

aldehydlösungen verdünnt werden müssen und nach F. Rachel¹⁾ tritt die Reaktion nur mit Spuren ein. Nach dem letzten Autor ist das Nichteintreffen der Reaktion erst dann ein Beweis für die Abwesenheit von Formaldehyd, wenn die Reaktion auch nach der weiteren Verdünnung des Untersuchungsmaterials nicht eintritt.

Die Reaktion kann auf verschiedene Weise ausgeführt werden, erforderlich dazu sind mehr oder weniger konzentrierte Mineralsäuren und die Gegenwart von Spuren eines Oxydationsmittels wie FeCl_3 , KNO_3 , H_2O_2 etc. Im Verlaufe der vorstehenden Untersuchung schloß ich mich der vom Kaiserl. Gesundheitsamt²⁾ angegebenen Arbeitsweise an, die so gehandhabt wird, daß man die zu untersuchende Lösung mit 2 ccm frischer Milch und 7 ccm Salzsäure versetzt. Die Salzsäure hat das spezifische Gewicht 1,124 und enthält in 100 ccm 0,3 ccm 5%ige Eisenchloridlösung. Diese Mischung wird nun im Reagenzglas während 1 Minute gekocht. Das Vorhandensein von Formaldehyd gibt sich durch mehr oder weniger starke Violettgefärbung der Lösung und des Koagulums zu erkennen. Dabei verhalten sich Lösung und Koagulum in der Färbung nicht gleichartig. Bei relativ hohen Formaldehydkonzentrationen ist nur das Koagulum violett gefärbt, die Lösung gelblich, während bei geringen Konzentrationen das Koagulum überhaupt nicht mehr auftritt und dann nur noch die Lösung gefärbt ist. Bei der Ausführung dieser Reaktion hat man sich durch Kontrollversuche zu überzeugen, daß die Milch selbst formaldehydfrei ist und daß sie überhaupt die Reaktion mit Formaldehyd gibt.

Es fiel mir auf, daß die Reaktion nicht immer mit der gleichen Intensität eintrat, und um diese Verhältnisse näher kennen zu lernen, stellte ich mir eine Farbenskala her. Das nächstliegende wäre gewesen, die Reaktion mit Milch und gemessenen Formaldehydmengen auszuführen und die zu untersuchenden Flüssigkeiten mit diesen Färbungen zu vergleichen.

¹⁾ Pharm. Zentralhalle, Bd. 54, S. 759 (1913). C. 1913, II, S. 903.

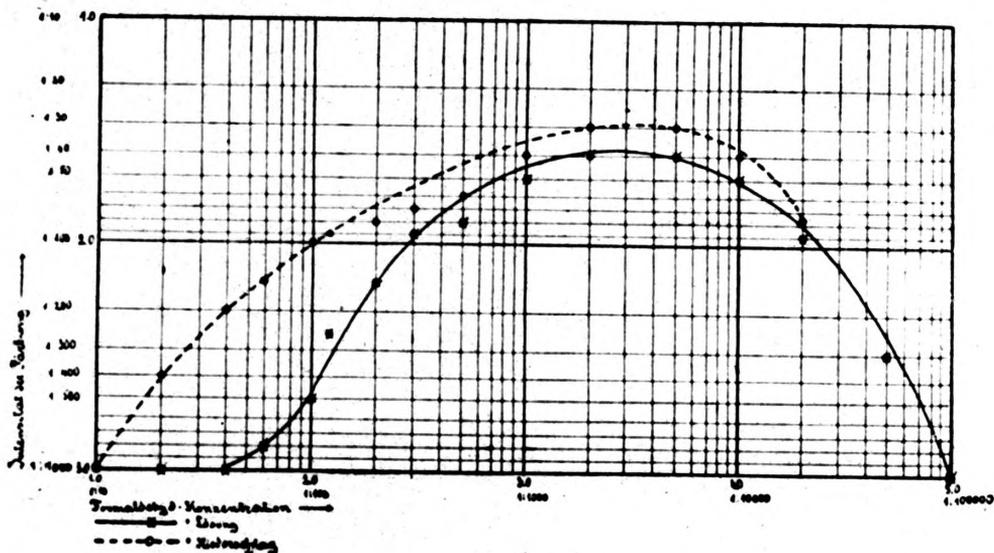
²⁾ Entwürfe zu Festsetzungen über Lebensmittel: Essig und Essigessenz, Heft 3, S. 16, Berlin 1912.

Allein dies ist nicht möglich, da die violette Farbe sehr unbeständig ist. Bei mittleren Formaldehydkonzentrationen erreicht die Farbe ihre größte Intensität nach 1 Minute Kochdauer, bei höheren schon nach $\frac{1}{2}$ Minute oder früher und bei niedern erst nach längerem Kochen. Beim Stehen verblaßt sie sichtlich und verschwindet nach einiger Zeit ganz. So stellte ich mir durch Mischen von Methylblau- und Diamantfuchsinlösungen eine Standardlösung her, deren rötlich-violetter Ton ungefähr der bei der Formaldehydreaktion auftretenden Farbe entsprach. Diese Lösung hat den Nachteil, daß sie auch nicht ganz beständig ist; mit geeigneteren Farbstoffen, die mir indessen nicht gerade zur Hand waren, wird man diesen Mangel leicht beseitigen können.

Als geeignetste Farbmischung erwies sich eine Lösung, die in 1 ccm 0,00066 g Fuchsin und 0,00033 g Methylblau enthielt. Sie wurde weiter verdünnt, indem ich je 1 ccm dieser Lösung auf 20, 30, 40 100, 200, 300 1000 ccm Wasser verdünnte und von diesen Lösungen je 15 ccm in Reagenzgläser füllte. Nachdem solchermaßen die Farbenskala hergestellt war, wurden auf ähnliche Weise Formaldehydlösungen bereitet. Zu diesem Zwecke verdünnte ich je 1 ccm käufliche, 40%ige Formalinlösung auf 10, 20, 40, 100 . . . 1000 . . . 10 000 . . . 100 000 ccm Wasser. Je 5 ccm dieser Lösungen wurden nun mit 2 ccm frischer Milch und 7 ccm eisenchloridhaltiger Salzsäure gekocht und die entstandene maximale Färbung mit der Skala verglichen. Die durch eine Reihe von Versuchen erhaltenen Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Dabei sind die Färbungen des Niederschlages und der Lösung getrennt aufgeführt, da sie sich, wie oben gesagt wurde, meistens nicht decken. Man sieht aus der Tabelle z. B., daß gewöhnliches Formalin, auf eine Konzentration von 1 : 1000 verdünnt (= 0,002 g HCOH in 5 ccm) eine Färbung ergibt, die für den Niederschlag einer Konzentration von 1 : 40 (= 0,00025 g Fuchsin + 0,00012 g Methylblau in 15 ccm Wasser) und für die Lösung einer Konzentration von 1 : 50 (= 0,0002 Rot + 0,0001 Blau in 15 ccm Wasser) der oben angegebenen Standardlösung entspricht.

Formaldehyd		Maximale Färbung	
Konzentration	Menge in 5 ccm Wasser g	Niederschlag	Lösung
1 : 10	0,2	1 : 1000	—
1 : 20	0,1	1 : 400	—
1 : 40	0,05	1 : 200	—
1 : 60	0,033	1 : 150	1 : 800
1 : 100	0,020	1 : 100	1 : 500
1 : 120	0,017	1 : 90	1 : 250
1 : 200	0,010	1 : 80	1 : 150
1 : 300	0,0066	1 : 70	1 : 90
1 : 500	0,0040	1 : 60	1 : 80
1 : 1000	0,0020	1 : 40	1 : 50
1 : 2000	0,0010	1 : 30	1 : 40
1 : 5000	0,0004	1 : 30	1 : 40
1 : 10000	0,0002	1 : 40	1 : 50
1 : 20000	0,0001	1 : 75	1 : 90
1 : 50000	0,00004	—	1 : 300
1 : 100000	0,00002	—	1 : 1000

Die Angaben der Tabelle werden viel deutlicher, wenn man sie aufzeichnet. In der beigegebenen graphischen Dar-



stellung sind auf der Abszisse die Formaldehydkonzentrationen in zunehmender Verdünnung, auf der Ordinate die Farb-

konzentrationen in abnehmender Verdünnung aufgetragen. Um die Kurve nicht zu stark auseinander zu ziehen, wurden als Längeneinheiten die Logarithmen der Verdünnung gewählt, z. B. für die Konzentration 1 : 1000 der Logarithmus von 1000 = 3,0, für 1 : 200 2,30 usw.

Es ergibt sich aus dieser Kurve sehr deutlich, daß die Reaktion nach Hehner, wie sie vom Kaiserl. Gesundheitsamt ausgearbeitet wurde, am besten bei einer Formaldehydkonzentration von 1 : 300 bis 1 : 20000 eintritt und daß sie unter und über diesem Konzentrationsbereich sehr rasch verschwindet.