

Über das Vorkommen der Fumarsäure im frischen Fleische.

Von

Hans Einbeck.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. März 1914.)

In einer früher erschienenen Arbeit: «Über das Vorkommen von Bernsteinsäure im Fleischextrakt und im frischen Fleische», ¹⁾ war es mir gelungen zu zeigen, daß nicht nur im Fleischextrakt, sondern auch im frischen Fleische, wenn auch nicht unmittelbar nach der Tötung des betreffenden Tieres, Bernsteinsäure als regulärer Bestandteil vorhanden ist. Da mir damals ganz frisch geschlachtetes Rindfleisch nicht zur Verfügung stand, so führte ich den Beweis, daß Bernsteinsäure gleich nach der Tötung im Muskelextrakt nachzuweisen ist, an Hundefleisch. Inzwischen ist mir nun gelungen, mir ganz frisches Rindfleisch zu beschaffen.

Ich erhielt seiner Zeit (26. XI. 1913) ein Stück Rindfleisch aus der Keule von ca. 13 Kilo. Das betreffende Tier war um 9.15 Uhr geschlachtet worden, und bereits um 11 Uhr waren 3 kg davon zerkleinert und zur Extraktion angesetzt. Der Rest des Rindfleisches wurde im Leichenkeller des Instituts bei + 2° aufbewahrt. Nach 14 Tagen (am 10. XII. 1913) wurden sodann 2,3 kg abgeschnitten und ebenfalls verarbeitet. Es zeigten sich dabei auf den Außenflächen Schimmelpilzkolonien und ein leicht-dumpfer Geruch machte sich bemerkbar. Innen erschien das Fleisch tadellos frisch, sowohl im Aussehen wie im Geruch. Nach weiteren vier Wochen (7. I. 1914) wurden nochmals 1,1 kg verarbeitet. Zu dieser Zeit zeigten sich auf der Oberfläche des

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 145.

Fleisches neben ausgedehnten Schimmelpilzkolonien feuchtschmierige Stellen, die wohl infolge von Bakterienwirkung entstanden sein mochten. Geruch intensiv. Innen sah das Fleisch ziemlich dunkel aus; Geruch etwas süßlich; beim Zermahlen in der Fleischmühle machte sich starke Klebrigkeit bemerkbar. Beim Eindampfen des wässerigen Extraktes trat vorübergehend Geruch nach Spargel (Methylmercaptan?) auf.

Die Extraktion des Fleisches durch Wasser erfolgte genau entsprechend den Angaben der ersten Arbeit.¹⁾ Vor der Extraktion im Zelmanowitschen Apparate wurde jedesmal ¹/₁₀ des wässerigen Auszuges abgetrennt und auf dem Wasserbad zunächst eingedampft und dann im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure möglichst zur Trockne gebracht. Dabei zeigten sich merkwürdige Unterschiede. Der Extrakt aus der ersten Fraktion zeigte nach dem Eintrocknen ein von gewöhnlichem Fleischextrakt (z. B. Liebig) ganz verschiedenes Aussehen. Es war eine schaumig erstarrte Masse, von gelblicher Farbe und angenehmem Geruch. Der Extrakt II zeigte bereits die dunkle Farbe, den charakteristischen Geruch und die Konsistenz des käuflichen Fleischextraktes, nur schieden sich nach kürzerem Aufbewahren im Vakuum Krystallaggregate aus, die bald die ganze Masse durchsetzten. Der Extrakt III zeigte Geruch, Aussehen und Farbe wie käuflicher Fleischextrakt und trocknete im Vakuum zu einer leimartigen Masse ein. Die Menge des erhaltenen Extraktes wuchs mit der Dauer der Lagerung, besonders aber innerhalb der ersten 14 Tage (34,0 g, 44,5 g und 45,7 g pro Kilogramm Fleisch). Eine nähere chemische Untersuchung der drei erhaltenen Extrakte konnte einstweilen noch nicht durchgeführt werden, da mich im Moment nur die sauren Extraktivstoffe derselben interessierten. Leider ist auch der Extrakt III durch einen ärgerlichen Zufall verloren gegangen.

Auch die Extraktion im Zelmanowitschen Apparat durch Äther + 10% Alkohol erfolgte genau wie früher beschrieben. Bei der Fraktionierung der Baryumsalze arbeitete ich insofern etwas anders, als ich den beim Eindampfen der

¹⁾ l. c., S. 152.

wässrigen Baryumsalzlösung sich ausscheidenden Niederschlag mit in die erste alkoholische Fällung hineinbrachte und nicht getrennt verarbeitete. In Versuch I und II (siehe Tabelle S. 307) sind die Baryumsalze I durch ca. 80%igen, die Baryumsalze II durch 90%igen Alkohol ausgefällt, im Versuch III wurde nur eine Fraktion mittels ca. 85%igen Alkohols isoliert.

Die Zersetzung der Baryumniederschläge erfolgte ebenfalls wie früher beschrieben. Es wurden aber dieses Mal die Gewichte der so gewonnenen Rohsäuren bestimmt, um einen Überblick zu erhalten, wie sich die Mengen der extrahierbaren Säuren mit dem Lagern des Fleisches verändern. Es zeigte sich, daß die Rohsäuren dabei ebenfalls beträchtlich ansteigen, und zwar auf das Kilo Fleisch berechnet von 3,56 g auf 4,96 g nach 14 Tagen, und 5,63 g nach 6 Wochen. Auch hier erfolgt die Hauptsteigerung innerhalb der ersten 14 Tage.

Zur Isolierung der Bernsteinsäure aus den meist sirupösen Rohsäuren wurden diese in ca. 5–10 Teilen Wasser gelöst und dann mit der gleichen Gewichtsmenge festen Silbernitrats versetzt. Es schied sich hierbei in mehreren Fällen in allerdings ziemlich kleinen Mengen ein sandiges Silbersalz aus, eine Erscheinung, welche schon früher beobachtet,¹⁾ aber nicht näher untersucht worden war. Dieses Mal wurde im vorkommenden Falle das Silbersalz am nächsten Tage abfiltriert, bis zum Verschwinden der Salpetersäure im Filtrat gewaschen und wie gewöhnlich durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Es wurden so geringe Mengen einer Säure erhalten, welche durch Analyse, Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und Titration gegen Kalilauge als Fumarsäure identifiziert werden konnte.

Das Filtrat von diesen Silbersalzen I wurde wie früher beschrieben auf Bernsteinsäure verarbeitet. Auch bei der Bernsteinsäure zeigte sich, ebenso wie bei den Rohsäuren ein erhebliches Ansteigen der aus je 1 Kilo Fleisch isolierten Säure (0,112 g zu 0,160 g zu 0,331 g). Die aus der ersten Fraktion isolierte Bernsteinsäure war fast farblos und gab mit Diazobenzolsulfosäure nur eine geringfügige Rotfärbung, die beiden

¹⁾ l. c., S. 155.

anderen Fraktionen enthielten eine gelbgefärbte Beimischung und gaben intensive Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure. Ich möchte hier beifügen, daß ich den Versuch III als beweiskräftig nur in dem Sinne ansehe, daß infolge der beim längeren Lagern des Fleisches eintretenden Veränderungen auch die Menge der gefundenen Bernsteinsäure ansteigt.

Der Nachweis der Fumarsäure im Extrakte von frischem Fleisch war mir zunächst sehr überraschend. Ich konnte aber zufälligerweise bald eine Erklärung für dieses Vorkommen auffinden. In meiner ersten Arbeit hatte ich schon, auf die Arbeiten von Batelli und Stern¹⁾ beziehend, darauf hingewiesen, daß der Nachweis für die Überführung der Bernsteinsäure in Äpfelsäure unter der Einwirkung von frischem Fleischbrei nicht erbracht sei. Nach einer persönlichen Rücksprache mit Fräulein Privatdozent Dr. L. Stern, Genf, hatte ich mich erboten, die chemische Untersuchung eines nach den Angaben von Batelli und Stern¹⁾ dargestellten Reaktionsgemisches durchzuführen. Fräulein Stern war daraufhin so freundlich, mir einen Extrakt, über dessen Herstellung sie selbst nachstehend berichtet, zur Aufarbeitung zu übersenden.

Fräulein Stern schreibt: „150 g feinzerriebene frische Rindermuskeln wurden mit Wasser sorgfältig ausgewaschen. Der Rückstand wurde mit dem 3fachen Volumen Wasser und mit bernsteinsaurem Natrium in einer Gesamtkonzentration von 3% versetzt und in einer Sauerstoffatmosphäre bei 40° energisch geschüttelt. Der Versuch wurde unterbrochen, als der weitaus größte Teil der Bernsteinsäure verschwunden war. Das Reaktionsgemisch wurde aufgeköcht, filtriert und das Filtrat im Vakuum bei 80° auf $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Volumens eingeeengt.“

Die Gesamtmenge des emulsionsartig getrübbten Extraktes betrug 41 ccm. 20 ccm hiervon wurden mit 60 ccm 20%iger Schwefelsäure, 40 ccm Wasser und 60 g Ammoniumsulfat in einen Extraktionsapparat nach Kumagawa gefüllt und während 12 Stunden mit alkoholfreiem Äther extrahiert. Aus dem ätherischen Extrakt hatten sich nach dieser Zeit derbe, glasglänzende

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 30, S. 172 (1910).

Krystalle ausgeschieden, die sich leicht abfiltrieren ließen. Das ätherische Filtrat wurde mit wenig Wasser versetzt und dann vorsichtig abgedampft. Die restierende wässrige Lösung wurde nach dem Filtrieren ohne weiteres Eindampfen verarbeitet.

Der Schmelzpunkt der gefundenen Krystalle war unscharf etwa $190-200^{\circ}$. Es zeigte sich oben im Schmelzpunktrohr das für Fumarsäure charakteristische Sublimat von Maleinsäureanhydrid. Die Erhitzung der Krystalle auf dem Platinblech ließ daneben unschwer die Gegenwart von Bernsteinsäure erkennen. Eine nähere Untersuchung der Krystalle wurde einstweilen wegen ihrer geringen Menge nicht ausgeführt.

Die oben erwähnte, aus dem Ätherextrakt erhaltene, wässrige Lösung wurde zunächst mit festem Silbernitrat versetzt. Dabei fiel sofort ein farbloses sandiges Silbersalz aus. Dasselbe wurde abfiltriert, bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion im Filtrat gewaschen und dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach dem Eindampfen resultierten 0,641 g einer farblosen krystallinischen Masse, die aus 20 ccm Wasser umkrystallisiert 0,278 g einer Säure lieferten, die durch Löslichkeit, Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und die Analyse als Fumarsäure identifiziert werden konnte. In der Mutterlauge konnten noch Reste derselben Säure neben Bernsteinsäure nachgewiesen werden. Das Filtrat der ersten Silberfällung wurde mit Ammoniak neutralisiert, und das dabei ausfallende Silbersalz gleichfalls mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die auf diese Weise erhaltenen 0,957 g Rohsäure lieferten, aus Wasser umkrystallisiert, reine Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 185° . Die Mutterlauge wurde mit Diazobenzolsulfosäure geprüft und zeigte nur eine ganz minimale Farbenänderung, welche die Anwesenheit von wesentlichen Mengen von Äpfelsäure ausschloß.

Um festzustellen, wie die Trennung von Fumarsäure und Bernsteinsäure über die Silbersalze verläuft, wenn man von den reinen Säuren ausgeht, wurde ein Gemisch von 0,3090 g Fumarsäure und 0,5820 g Bernsteinsäure in 50 ccm Wasser heiß gelöst und zu der noch nicht ganz abgekühlten

Lösung 3,0 g festen Silbernitrats hinzugefügt. Es schied sich dabei sofort ein charakteristisches Silbersalz aus, welches nach 24stündigem Stehen abfiltriert und nach dem Waschen bis zur Freiheit von Salpetersäure mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Nach dem Eindampfen hinterblieben 0,411 g Substanz, welche in 14 ccm Wasser in der Siedehitze gelöst nach dem Abkühlen 0,235 g Fumarsäure (F. 285–86°) lieferten. Aus dem Filtrat wurden noch 0,048 g Fumarsäure (F. 270°) gewonnen. Die Endmutterlauge zeigte mit Diazobenzolsulfosäure die für Fumarsäure charakteristische Rotbraunfärbung. Das Filtrat des ersten Silberniederschlags wurde wie gewöhnlich mit Ammoniak neutralisiert, der entstehende Niederschlag nach 24 Stunden filtriert, sorgfältig gewaschen und dann zersetzt. Es resultierten 0,465 g Substanz. Diese wurden mit ca. 4 ccm Wasser erhitzt. Dabei hinterblieb ein geringer unlöslicher Rückstand, der durch Filtration entfernt wurde. Aus dem Filtrat krystallisierten 0,222 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 185° aus. Die Mutterlauge gab mit Diazobenzolsulfosäure keine nennenswerte Färbung. Der Versuch mit reinen Säuren zeigte, daß bei der Trennung der Fumarsäure von der Bernsteinsäure über die Silbersalze 91% der Fumarsäure wiedergewonnen werden können.

Das Ergebnis der qualitativen Aufarbeitung des Oxydationsgemisches nach Batelli und Stern, die neben der ursprünglich angewendeten Bernsteinsäure allerdings nicht Äpfelsäure, wohl aber Fumarsäure lieferte, ist zwar ebenso überraschend, wie die Auffindung von Fumarsäure im Extrakte von frischem Rindfleisch, es stimmt aber durchaus mit den physikalisch-chemischen Beobachtungen von Batelli und Stern überein. Denn um Bernsteinsäure in Fumarsäure überzuführen, bedarf es auf ein Molekül Säure ein Atom Sauerstoff, genau so viel, wie Batelli und Stern bei ihren Oxydationsversuchen gefunden haben, und wie gleichfalls nötig wäre, um Bernsteinsäure in Äpfelsäure überzuführen. Über den Verlauf des Überganges von Bernsteinsäure in Fumarsäure konnte einstweilen nichts ermittelt werden. Näheren Aufschluß hierüber werden vielleicht spätere, quantitativ durchzuführende Versuche liefern,

durch welche vor allen Dingen festgestellt werden muß, wie sich die Mengen der aus dem Reaktionsgemisch wieder gefundenen Säuren zu dem Gewicht der ursprünglich angewendeten Bernsteinsäure verhalten.

Tabelle.

Datum	Angewendete Fleischmenge kg	Extraktgewicht		Fällung	Gesamte isolierte Säure		Fumarsäure		Bernsteinsäure	
		g	per 1 kg Fleisch		g	per Kilo Fleisch	g	per Kilo Fleisch	g	per Kilo Fleisch
26. XI. 1913	3,0	102,0	34,0	Ba-Salz I	5,68	1,87	0,085	0,028	0,29 ¹⁾	0,096
				• II	4,20	1,4	—	—	0,046	0,015
				Rest	0,80	0,26	—	—	—	—
					10,68	3,56			0,336	0,112
10. XII.	2,3	102,5	44,5	Ba-Salz I	4,47	1,94	0,065	0,028	0,308	0,134
				• II	5,84	2,54	—	—	0,061	0,026
				Rest	1,09	0,48	—	—	—	—
					11,40	4,96			0,369	0,160
7. I. 1914	1,1	50,3 ²⁾	45,7	Ba-Salz	4,12	3,75	0,103 ³⁾	0,091	0,364	0,331
				Rest	2,07	1,88	—	—	—	—
					6,19	5,63			0,364	0,331

Analysen.⁴⁾

I. Fumarsäure.

A. Substanz stammt aus Versuch 26. XI. 13.

4,152 mg Substanz gaben 6,31 mg CO₂ und 1,37 mg H₂O.

B. Substanz stammt aus Versuch 10. XII. 13.

4,255 mg Substanz gaben 6,45 mg CO₂ und 1,43 mg H₂O.

C. Substanz stammt aus dem Oxydationsgemisch von Batelli und Stern.

¹⁾ Geringer Verlust.

²⁾ Geringer Verlust.

³⁾ Ob bei diesem Versuch nicht noch andere Säuren mit in die Fumarsäure gegangen sind, konnte nicht näher festgestellt werden.

⁴⁾ Die Mikroanalysen verdanke ich wieder Herrn Dr. Hans Lieb, Graz, Assistent von Herrn Prof. Pregl.

4,221 mg Substanz gaben 6,43 mg CO_2 und 1,34 mg H_2O .

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ (116):

Gefunden:

C = 41,37%	A = 41,45%, B = 41,20%, C = 41,54%
H = 3,49%	A = 3,69%, B = 3,75%, C = 3,55%

0,0462 g Substanz, stammend aus Versuch 7. I. 14. brauchten zur Neutralisation 14,5 ccm $\frac{n}{20}$ -Kalilauge, berechnet 15,9 ccm.

II. Bernsteinsäure.

Substanz stammt aus Versuch 26. XI. 13.

4,714 mg Substanz gaben 7,06 mg CO_2 und 2,06 mg H_2O .

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ (118):

Gefunden:

C = 40,66%	40,84%
H = 5,13%	4,89%

Zusammenfassung.

Das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Fumarsäure im Extrakte von frischem Rindfleisch.

Sodann beweist die Arbeit erneut, daß die Bernsteinsäure ein regulärer Bestandteil des Extraktes aus lebend frischem Rindfleisch ist. Ob sie als solche im frischen Muskel selbst enthalten ist, muß dahingestellt bleiben. Für diese Auffassung spricht aber vielleicht die Auffindung von nicht unerheblichen Mengen Fumarsäure. Im ersten Versuche wurden auf 0,29 g Bernsteinsäure 0,085 g = ca. 30% Fumarsäure gefunden.

Es konnte ferner durch die qualitative Aufarbeitung eines Oxydationsversuches der Bernsteinsäure mittels frischen Fleischbreies nach Batelli und Stern bewiesen werden, daß das Hauptreaktionsprodukt dieses Versuches nicht Äpfelsäure, sondern Fumarsäure ist.

Anhaltspunkte für die Anwesenheit von Äpfelsäure im Reaktionsgemisch nach Batelli und Stern haben sich nicht ergeben. Die Frage, ob im Extrakt von frischem Fleisch Äpfelsäure vorhanden ist, konnte infolge der bisher sehr unbefriedigenden Nachweismethoden noch nicht mit Sicherheit entschieden werden.