

Zeitschrift:	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber:	Bundesamt für Gesundheit
Band:	57 (1966)
Heft:	2
Artikel:	Untersuchungen über die papierchromatographische Bestimmung niedriger flüchtiger Fettsäuren der Fische
Autor:	Wierzchowski, J. / Witkowski, H.
DOI:	https://doi.org/10.5169/seals-983111

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 27.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE

Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT:

Schweiz Fr. 22.— per Jahrgang (Ausland Fr. 27.—)	Preis einzelner Hefte Fr. 4.— (Ausland Fr. 5.—)
Suisse fr. 22.— par année (étranger fr. 27.—)	Prix des fascicules fr. 4.— (étranger fr. 5.—)

Band - Vol. 57

1966

Heft - Fasc. 2

Untersuchungen über die papierchromatographische Bestimmung niedriger flüchtiger Fettsäuren der Fische

Von *J. Wierzchowski* und *H. Witkowski*

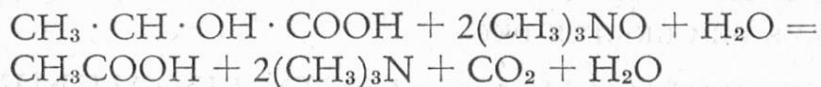
Mitteilung aus dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Med. Akademie in Gdańsk

Einführung

Die während der Zersetzung des Fischfleisches auftretenden Veränderungen sind sehr verschieden und von vielen Faktoren abhängig. Ihr Ursprung sind diverse chemische Reaktionen wie z. B. die auf hydrolytische Prozesse und Molekülabbau zurückzuführende Veränderungen der Eiweißsubstanzen, die Oxydation einiger Bestandteile, sowie enzymatische Veränderungen. Aus diesem Grunde ist das Kriterium des Fischverderbs für die einzelnen Fischgattungen sehr verschieden. Es ist bis heute noch nicht gelungen, eine Untersuchungsmethode sowie einen objektiven Frischetest für alle Fischarten auszuarbeiten (1, 2, 3, 4). Die vorhandenen Methoden beruhen entweder auf einer qualitativen bzw. quantitativen Bestimmung verschiedener Verbindungen oder einer Bestimmung der physikalisch-chemischen Daten die parallel zum Frischegrad einer Veränderung unterliegen.

Die aus dem Fischfleisch von verschiedenem Verderbsgrad isolierten Stoffe können einen sauren oder alkalischen Charakter haben. Die Hauptbestandteile der sauren Stoffe sind die niedrigen Fettsäuren. Nach *Collins* (5) entsteht die Essigsäure aus der Milchsäure unter Mitwirkung eines noch nicht bekannten Vorläufers.

Watson (6) erklärt die Entstehung der Essigsäure nach folgender Gleichung:



In der Zusammenfassung weitläufiger Untersuchungen über die Gütebeurteilung der Garnelen stellten *Collins, Seagran* und *Iverson* (7) fest, daß sowohl Trimethylamin wie auch die flüchtigen Säuren einen Anhaltspunkt für die Bakterieneinwirkung sein können. *Ritter* (8), der das Vorkommen der flüchtigen Säuren im Käse untersuchte, kommt zur Annahme, daß die Art und Menge der entstehenden Säure von den im Käse vorhandenen Mikroorganismen abhängig ist. *Hirsch* (9) führt die Entstehung folgender Säuren auf die mikrobiologische Zersetzung einiger Aminosäuren zurück:

Aminosäure	Fettsäure
Histidin, L-Asparaginsäure, D-Glutaminsäure	Ameisensäure
Alanin, L-Serin, D-Glutaminsäure, Glykokoll, u. a.	Essigsäure
Threonin, L-Aminobuttersäure, Asparagin	Propionsäure
Norvalin, L-Leucin, Asparagin, D-Glutaminsäure	n-Buttersäure
Valin, L-Leucin	Isobuttersäure
Isoleucin	1-Methylbuttersäure
Norleucin, L-Leucin	n-Valeriansäure
Leucin	Isovaleriansäure

In dem zugänglichen Schrifttum sind nur wenige Arbeiten den niedrigen Fettsäuren im Fischgewebe als evtl. Faktor seiner Frischebeurteilung gewidmet. Die Aufmerksamkeit der Forscher konzentriert sich hauptsächlich auf die gesamte Säurefraktion und nicht auf die einzelnen Säuren. Es wird allgemein behauptet, daß die flüchtige Säurefraktion mit dem Fischverderb wächst. Die Zusammensetzung dieser Fraktion jedoch ist immer noch diskutabel und oft kontrovers. Ge nannt seien hier die Arbeiten von *Hughes* (10), *Charuley* (11), *Uchiyama* und *Yokoyama* (12), *Amano* und *Tomiya* (13), *Suzuki* (3, 14), *Hillig* (15) sowie *Wierzchowski* und *Severin* (16). Das genaue Studium der obengenannten Arbeiten führt zur Schlußfolgerung, daß die quantitative Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in Nahrungsprodukten von wesentlicher Bedeutung für die sanitäts hygienische Bewertung dieser Produkte sein kann. Die Ausarbeitung einer geeigneten analytischen Methodik sowie die genaue Erfassung der in frischen und verdorbenen Fischen auftretenden Fettsäuren kann zu einer eingehenden Be trachtung des ganzen Problems sowie zur Schaffung eines objektiven Frische testes und damit zur Genußtauglichkeitsbestimmung ausgewertet werden. Für die Untersuchungen wählte man Süßwasserfische, da in der Fachliteratur keine An haltspunkte über die Bestimmung der niedrigen flüchtigen Fettsäuren im Zu sammenhang mit dem Verderb dieser Art von Fischen gefunden werden konnten.

I. Die chromatographische Analyse

1. Vorhandene Methoden

Lugg und Owerell (17) bewiesen im Jahre 1947, daß mittels Papierchromatographie organische Säuren analysiert werden können. In der Fachliteratur fand man ungefähr 20 Arbeiten über die papierchromatographische Trennung von niedrigen flüchtigen Fettsäuren. Diese Arbeiten können wie folgt charakterisiert werden:

1. Die flüchtigen Fettsäuren können ihrer physikalischen Eigenschaften wegen nicht ohne Verluste in freiem Zustand auf das Papier aufgetragen werden. Das Auftragen erfolgte in Form von Hydroxamverbindungen (12, 18, 19), Na oder K-Salzen (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26), NH₄-Salzen (24, 27, 28, 29, 30, 31), Aethyl- oder Diäthylaminoverbindungen (8, 32, 33, 34, 35, 36) bzw. in Form von Morpholin-Salzen (10, 37). Zu diesem Zweck wurden die Lösungen der flüchtigen Fettsäuren mit den entsprechenden alkalischen Lösungen auf pH 7,5—9,0 gebracht und dann bis zu einer Konzentration, die das Auftragen ermöglichte, verdünnt oder eingeengt (0,1—1%).

2. Als mobile Phase bei dem Chromatographieren wendete man stark alkalische Lösungsmittel, wie z. B. mit Ammoniak gesättigtes Butanol (20, 21, 23, 24, 25, 30, 31) und Propanol (28) sowie Aethylamin (8, 34, 36) an. Nur in Ausnahmefällen wurden Lösungsmittelgemische (10, 37) verwendet, wobei zugleich festgestellt werden konnte, daß die Zunahme der Alkoholmenge den Rf-Wert sinken und umgekehrt die Zunahme der Wassermenge den Rf-Wert wachsen ließ. Lindquist und Storgårds (38) verwandten mit Erfolg Butanol, das mit Wasser gesättigt war in einer 0,1-n Aethylaminlösung gesättigten Kammer.

3. In der Entwicklungstechnik fanden folgende Farbstoffe Anwendung, welche in den Grenzen von pH 4—9 sich verändern, um dem Einfluß des pH-Wechsels auf die Farbfleck-Papiere Rechnung zu tragen:

Bromphenolblau	pH 3,1— 4,4
Bromkresolgrün	pH 4,0— 5,6
Methylrot	pH 4,2— 6,3
Bromkresolpurpur	pH 5,2— 6,8
Bromthymolblau	pH 6,0— 7,6
Phenolrot	pH 6,8— 8,4
Kresolrot	pH 7,2— 8,8
Thymolblau	pH 8,0— 9,6
Phenolphthalein	pH 8,3—10,5
Thymolphthalein	pH 9,3—10,5

Einzelne Farbstoffe wurden in 0,04%iger alkoholischer Lösung, Farbstoffgemische in einer alkoholischen Lösung von 0,02% eines jeden Farbstoffes angewandt. Auf diese Weise erhöhte sich die Zahl der zur Entwicklung geeigneten Indikatoren auf über 20. Die entwickelten Farbflecke waren stets unbeständig.

4. Die in der Fachliteratur angegebenen Entwicklungsmethoden lassen sich wie folgt systematisieren:

a) Besprühen mit Farblösungen von niedrigem pH — mit Zitronensäure ange-säuerte Bromphenolblaulösung (17, 22, 39, 40). Die chromatographierten Säuren binden Ammoniak auf der Höhe ihrer Farbflecke (41). Diese Farbflecke sind also alkalisch, während die Grundlage, das Papier, sauer ist. Bei dem Verdampfen des Ammoniaks schwinden jedoch die Farbflecke rapide.

b) Besprühen mit Farblösungen von hohem pH — angewandt wurden einzelne Farbstoffe (8, 22, 23, 25, 28, 31, 34, 36) bzw. alkalische Farbstoffgemische (24, 26) von pH 7,5—10 oder auch mit 0,1-n NaOH genau neutralisierte Gemische. Auch in diesem Falle sind die Farbflecke sehr unbeständig, da sie dem Einfluß des CO₂ der Luft unterliegen. *Isherwood* und *Hanes* (28) wandten eine Besprühung in CO₂-freier Atmosphäre an und *Reid* und *Lederer* (31) sowie *Schwartzman* (26) eine Besprühung mit Farbstofflösungen, denen Formaldehyd zugesetzt war sowie eine Entwicklung der Chromatogramme mit Ammoniak-dämpfen.

c) Anwendung anderer chemischer Reaktionen — ammoniakalische Silber-nitratlösung (28). Die naturgemäß im Papier auftretenden Substanzen färben den Grund dunkelbraun, während die Flecke weiß blieben. Dieser Kontrast kann durch eine Glukosebenetzung des Papiers vertieft werden. In diesem Falle erscheint die Ameisensäure, ihrer reduktiven Eigenschaften wegen, sofort. Auch Chloroform-Ninhydrinlösungen wurden mit Erfolg angewandt. Der Ninhydrin-test ist jedoch nicht spezifisch, da einige ninhydrinpositive Verbindungen, wie z. B. Peptide, Amine, Aminosäuren und deren Derivate, ebenfalls Farbverbindungen geben.

d) Bemerkt sei, daß verschiedene Salze derselben Säure bei gleicher Entwicklung verschiedene Farbflecke ergeben, wie z. B. Na-Salze, die bei der Besprühung mit einer schwach sauren Bromphenolblaulösung gelbe Farbflecke auf blauem Grund, während NH₄- und Aethylamino-Salze umgekehrt blaue Farbflecke auf gelbem Grund ergeben.

5. Von Papiersorten fanden vor allem *Whatman* Nr. 1, ausnahmsweise *Whatman* Nr. 3 (37) und Nr. 54 (24) sowie *Schleicher-Schüll* Nr. 2043 (23) Anwendung. Das Papier wurde vor dem Gebrauch nicht besonders vorbereitet. Einige Autoren (19, 24, 28, 29) halten es für nötig, das Papier vor Gebrauch, hauptsächlich bei quantitativen Bestimmungen, zu waschen, um die im Papier enthaltenen Kationen, welche mit den Säuren reagieren und auf die Trennung ungünstig einwirken, zu entfernen.

6. Vorwiegend wurde die absteigende eindimensionale, seltener die aufsteigende und ausnahmsweise die horizontale Chromatographie angewandt. Die Laufzeit betrug in der Regel 24 und mehr Stunden.

7. Die Mehrzahl der Methoden (8, 21, 22, 26, 27, 28, 29, 32, 33) wurden zu qualitativen Bestimmungen der niedrigen flüchtigen Fettsäuren angewandt. Einige

Autoren (23, 24, 25, 31, 34, 36) halten jedoch die planimetrische, quantitative Auswertung der Farbflecke für möglich.

8. Die obengenannten Methoden haben ohne Hinweis auf eine praktische Anwendung vorwiegend theoretischen Wert. Nur vereinzelte betreffen bestimmte Produkte wie z. B.

- a) Untersuchung von Käse — *Hiscox, Merrson* (40) sowie *Lindquist, Storgårds, Garansson* (36),
- b) Untersuchung von Tabakrauch — *Buyske, Wilder, Hobs* (42),
- c) Untersuchung von Silage — *Virtanen und Miettinen* (35),
- d) Untersuchung von Gärflüssigkeit — *Janicki, Niewiarowicz, Skorupski* (25),
- e) Untersuchung von Bakterien — *Aleksandrowicz* (20),
- f) Untersuchung von Seefischen *Suzuki* (3, 14), *Uchiyama* und *Yokoyama* (12), *Hillig* (15), *Hughes* (10),
- g) Untersuchung von Walfischen — *Amano* und *Tomiya* (13).

2. Eigene Untersuchungen

Die verhältnismäßig große Anzahl verschiedener analytischer Methoden erschweren die richtige Auswahl. Notwendigerweise mußten sie im Laboratorium geprüft werden. Alle Versuche wurden mit einem Säuregemisch der Säuren C₁-C₆, die mit den entsprechenden Alkalien auf pH-9 titriert die Na, NH₄, Aethylamino- und Morpholin-Salze ergaben, durchgeführt. Das angewandte Papier *Whatman* Nr. 1 wurde vor Gebrauch nicht gewaschen. Auch andere Papiersorten wurden ausprobiert. Den Ausgangspunkt einer jeden Versuchsreihe stellte eine der Methoden dar, die genau nach den Vorschriften des Schrifttums angewandt, im weiteren Verlauf modifiziert wurde. Die gesamten durchgeführten Untersuchungen sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Nach der Trocknung bei Zimmertemperatur bis zur völligen Verdampfung des Lösungsmittels wurden die Chromatogramme mit nachfolgenden Entwicklern besprüht:

1. 0,04%ige wäßrige, mit 0,1-n NaOH (22) auf pH 7,5 gebrachte Bromthymolblaulösung.
2. 0,04%ige, in einer Mischung von Formaldehyd und Aethylalkohol (1 : 5) mit 0,1-n NaOH (31) auf pH = 5 gebrachte Bromkresolpurpurlösung.
3. 0,25%ige wäßrige Bromkresolgrünlösung (36).
4. 0,04%ige Mischung von Bromthymolblau und Methylrotlösung (24).
5. 1%ige, mit 0,1-n NaOH (25) auf pH = 7,5 gebrachte Bromkresolpurpurlösung in 20%igem Aethanol.
6. 0,2%ige Phenolrotlösung in 95%igem Aethanol (34).
7. Lösung von 0,2 g Kresolrot in 15 ml Wasser und 70 ml 96%igem Aethanol, dem 0,3 ml 1-n Na OH zugesetzt war und der vor dem Gebrauch mit Veronal gepuffert wurde.

Tabelle 1 Zusammenstellung der durchgeföhrten Untersuchungen

Lösungsmittel	Salz	Brown, Hall (22)	Reid, Lederer (31)	Janicki und Mitarbeiter (25)	Lindquist und Mitarbeiter (38)	Duncan, Porteons (24)	Manganelli, Brofazi (34)	Schwartzman (26)	Hughes (10)	Eigene Unter- suchungen
Mit 1,5 n NH ₄ OH gesättigtes Butanol (22)	Na NH ₄ Aethyl- amin Morpho- lin	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++
Mit 1,5 n NH ₄ OH gesättigtes Propanol (28)	Na NH ₄ Aethyl- amin Morpho- lin	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++
Butanol, Cyclohexan Propylenglykol Ammonium, Morpholin (41)	Na NH ₄ Aethyl- amin Morpho- lin	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++
Aethylamingesättigtes Butanol (38)		++	++	++	++	++	++	++	++	++

+ Eigene Modifikation

++ Wiederholung nach Literaturangaben

+++ Ausgearbeitete Methode

8. Lösung von je 0,2 g Methylrot und Bromthymolblau in 500 ml einer Mischung von Formaldehyd und Aethanol (1 : 4), die mit 0,1-n NaOH (26) auf pH = 5,2 gebracht wurde.

In jedem Fall wurden verschiedene Arten der Besprühung angewandt. Um die Vorteile und Nachteile der einzelnen chromatographischen Methoden zu prüfen, wurde eine Reihe von Versuchen unter Anwendung folgender Verfahren durchgeführt: absteigende, aufsteigende, horizontale und Rundfilterchromatographie. Das Ergebnis dieser Versuche führte zu nachstehenden Schlußfolgerungen:

1. Die Anwendung von großen Kammern erschwert die Erhaltung gleicher Versuchsbedingungen, was ungünstig auf die Reproduzierbarkeit der Rf-Werte und auf die Größe der Farbflecke wirkt.

2. Die erhaltenen Farbflecke waren nicht immer auf dem farbigen Grund des Papiers genügend deutlich zu erkennen und schwanden schnell. Die Entwicklung mit Ninhydrinlösung ergab beständige Farbflecke, jedoch die Empfindlichkeit dieser Färbungsmethode ist unzureichend.

3. Bei der Trennung der NH_4 - und Aethylaminosalze sind die Verluste bedeutend, während bei Na-Salzen das Na die Farbflecke der Essigsäure und sogar Propionsäure teilweise verdeckt.

4. Die besten Ergebnisse wurden mit Morpholinsalzen erzielt. Die Anwendung von Morpholinsalzen hat folgende Vorteile:

a) Nach dem Auftragen der Lösungen auf das Papier werden keine quantitativen Veränderungen, auch bei langanhaltender Trocknung, beobachtet.

b) Der Morpholinüberschuß stört die Identifizierung der Säuren nicht, da er auf der Startlinie zurückbleibt und keine Farbreaktion mit dem Säureentwickler ergibt.

c) Ein kleiner Überschuß von Morpholin verhindert die Oxydation der Säuren. Die Standard-Lösungen der Säuren sowie aus dem Versuchsmaterial erhaltene Säurelösungen sind unbegrenzt haltbar. Bei mehr als 3jähriger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurden keinerlei Veränderungen festgestellt.

5. Die Ameisensäure konnte nicht von der Essigsäure und Iso-Formen nicht von den N-Formen getrennt werden.

6. Als beste Form der Trocknung wird die Trocknung bei Zimmertemperatur (18—20 °C) ohne mechanischen Luftstrom angesehen. Die Trocknung ist nach 10—15 Minuten beendet. Der Raum, in dem die Chromatogramme getrocknet werden, muß gut gelüftet werden, da die Laboratoriumsluft einen merklichen Einfluß auf die Chromatogramme hat. Eine Beschleunigung der Trocknung durch Erhitzen und Luftstrom hat deutliche Säureverluste zur Folge.

7. Die besten Ergebnisse wurden mit den Farbstoffen von pH = 7,5—9 erhalten, wobei Kresolrot, mit Veronal gepuffert, als bestgeeignet angesehen werden kann. Mit Phosphatpuffern waren die Ergebnisse weniger gut.

8. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Chromatographiepapier *Whatman* Nr. 1 erzielt.

9. Das Durchziehen der Streifen durch den Entwickler war ungünstiger als die Besprühung, da es die Farbflecke verwischte, obgleich ihre Haltbarkeit größer war.

Auf Grund der durchgeführten Versuche konnte man einen Arbeitsgang vorschlagen, der die in der Fachliteratur beschriebenen Nachteile beseitigte. Die eigene Methode wird in größerem Maße den Anforderungen der modernen Analyse gerecht: Bedeutende Vereinfachung, Zeitersparnis, Wirtschaftlichkeit, Möglichkeit der Anwendung in Serienuntersuchungen und größere Genauigkeit.

Die eingehende analytische und statistische Bearbeitung erforderte folgenden Arbeitsgang:

Apparatur:

Runde Chromatographiekammer vom Durchmesser 10 cm und einer Höhe von 20 cm, die mit einem geschliffenen Deckel, der zusätzlich mit einem Gummiring abgedichtet wurde, versehen war. Am Boden der Kammer war ein Behälter, in den mittels eines mit dem Deckel verbundenen Glasrohres das Lösungsmittel, nach der Sättigung der Kammer, gebracht wurde.

Ein Thermostat, der die konstante Temperatur von 50—60 °C während des Chromatographierens erhielt.

Vorrichtung zum Trocknen und Besprühen der Chromatogramme (Stativen zum Trocknen, Rotationspumpen, Zerstäuber usw.).

Kalibrierte Pipetten von 0,1 ml mit einer 0,01 ml Skala, zum Auftragen der untersuchten Lösungen, sowie Pipetten mit einem Ansatz nach Czerepka (44) zu quantitativen Bestimmungen.

Reagenzien:

niedrige flüchtige Fettsäuren C₁—C₆ chem. rein p. A.*

Morpholin chem. rein p. A.*

n-Butanol, bei 116—118 °C redestilliert.

Aethanol, chem. rein p. A.

1,5-n Ammoniak, mit frischem redestilliertem Wasser zubereitet.

Farblösungen zur Entwicklung:

a) 0,2 g Kresolrot aufgelöst in 15 ml Wasser, dem 0,3 ml 1-n NaOH zugegeben war und nach der Auflösung 70 ml 96%iger Aethanol zugesetzt wurde.

b) 10 g Veronalnatrium wurden in 100 ml Wasser und 150 ml Aethanol gelöst.

Vor dem Gebrauch wurden 3 Teile der Farblösung (a) mit 1 Teil Farblösung (b) gemischt.

Das Chromatographiepapier *Whatman* Nr. 1 wurde ohne Waschen in Bogen von 17×24 cm in die runde Kammer gebracht.

* Zur Verfügung gestellt vom Leiter des Lehrstuhles für Organische Chemie der Med. Akademie in Łóds, Prof. Dr. Z. Jerzmanowska.

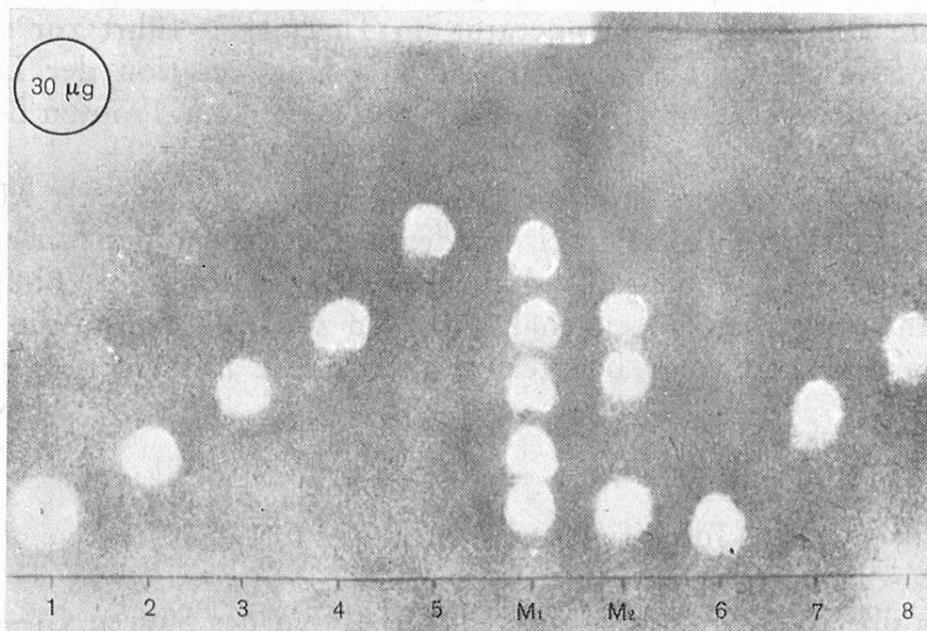
Arbeitsgang:

Vorbereiten der Standard-Lösungen der Säuren: Die entsprechenden Säuremengen werden in einer kleinen Menge 50%igen Aethanols gelöst, mit Morpholin auf $\text{pH} = 9$ gebracht und dann zur 1%igen Lösung mit 50%igem Aethanol aufgefüllt. Von dieser Stammlösung wurden durch Verdünnen mit 50%igem Aethanol weitere Standard-Lösungen erhalten.

Vorbereiten der Lösungsmittel: Das redestillierte n-Butanol wird mit 1,5-n Ammoniak gesättigt, die obere Schicht wird als Lösungsmittel und die untere als Kammersättigungsmittel verwandt.

Vorbereiten des Papiers: Aus großen Papierbogen wurden kleinere vom Format 17×24 cm geschnitten und in einer Entfernung von 2 cm vom Rande der längeren Seite die Startlinie markiert. Dann wurden mit einer Mikropipette 1—10 μl , meistens 5 μl , der Säurelösungen aufgetragen. Nach der Trocknung wurde das Papier in Form eines Zylinders zusammengenäht und in die vorbereitete Chromatographiekammer gebracht.

Das Chromatographieren: Unmittelbar vor dem Versuch wurden auf den Boden der Kammer ca. 5—10 ml mit n-Butanol gesättigte 1,5-n Ammoniaklösung gebracht und die Petrischale aufgestellt. In die so vorbereitete Kammer brachte man nun das in Form eines Zylinders zusammengenähte Papier mit den aufgetragenen Säurelösungen. Nach dem Abdichten wurde die Kammer für 10—20 Minuten in den Thermostat von 50—55 °C gestellt. Nach der Sättigung der Kammer wurden ca. 20 ml mit 1,5-n Ammoniak gesättigtes Butanol mittels der Glasröhre in die Petrischale gegossen und bei 50—55 °C, bis die Lösungsmittelfront den



oberen Rand des Bogens in einer Entfernung von 1—2 cm erreichte, weiter chromatographiert. Die Laufzeit betrug 1,5—2 Stunden.

Das Trocknen und Besprühen des Papiers: Nach Beendigung des Chromatographierens wurde der Bogen aus der Kammer genommen und an der Luft bis zur völligen Verdampfung des n-Butanols getrocknet. Das trockene Papier wurde mit einer frisch zubereiteten gepufferten Kresolrotlösung besprüht. Die Luft zum Zerstäuben wurde aus der Rotationspumpe zugeführt, was eine gleichmäßige Geschwindigkeit des Besprühens zur Folge hatte. Das Papier muß immer genau auf dieselbe Art und Weise besprüht werden, um reproduzierbare Werte bei der quantitativen Bestimmung zu erhalten. Die entwickelten Farbflecke sind gelb auf rotvioletter Grund.

Auf dem Chromatogramm 1 fanden folgende Bezeichnungen Anwendung:

1 = Essigsäure	6 = Ameisensäure
2 = Propionsäure	7 = Isobuttersäure
3 = Buttersäure	8 = Isovaleriansäure
4 = Valeriansäure	$M_1 = 1 + 2 + 3 + 4 + 5$
5 = Capronsäure	$M_2 = 6 + 7 + 8$

Da die Farbflecke sehr unbeständig sind, wurden sie sofort mit einem Bleistift umrissen und zu Dokumentationszwecken photographiert. Bei Schwarz-weiß-Aufnahmen sind die gelben Flecke schwarz und der rotviolette Grund weiß.

Die gelben Farbflecke werden schnell größer und in kurzer Zeit ist das ganze Papier gelb.

Eine weitere Erhöhung der Temperatur im Thermostat führt zur schnelleren Trennung der Säuren, hat aber eine bedeutende Kondensation der Dämpfe an den Wänden der Kammer zur Folge und die herabfallenden Tropfen beschädigen das Chromatogramm.

Es wurden auch Versuche über die Anwendungsmöglichkeit der Methode zu Serienanalysen durchgeführt. Hierbei wurden bei gleichen Versuchbedingungen Kammern von 20 cm Durchmesser und gleicher Höhe angewendet. Einige Papierrollen, in Zylinderform zusammengenäht, wurden zugleich, eine in die andere, in die Kammer gebracht und somit bei gleicher Laufzeit bis zu 200 Ergebnisse erzielt.

Die Identifizierung der Säuren C_1-C_8

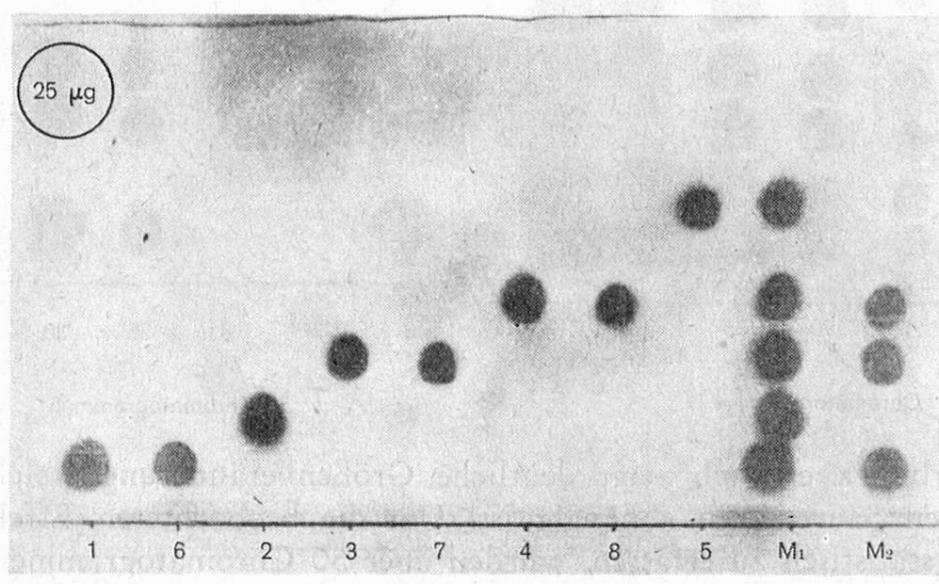
Es wurden über 800 chromatographische Analysen der Säuren C_1-C_8 durchgeführt, indem man Mengen von 10—50 μg der Säuren auftrug und den Rf-Wert ermittelte. Die statistische Bewertung der Rf-Bestimmungen zeigt die Tabelle 2.

Tabelle 2 Statistische Auswertung der R_f -Werte

Säure	Min.	Max.	Arithmetischer Mittelwert $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$	Summe der Abweichungs- quadrate $\sum (x - \bar{x})^2$	Freiheitsgrad n	$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$	Standard- abweichung $S_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$	Standard- fehler $S_x / \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$	Variabilitäts- koeffizient $V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \%$	Bestimmungs- präzision $2S$
	Mes- sung	Mes- sung								
C_1	9,15	11,89	10,86	46,3758	100	0,68	0,068	0,068	6,2	1,36
C_2	10,63	13,90	11,84	66,4906	100	0,81	0,081	0,081	6,7	1,62
C_3	20,98	23,94	22,19	24,5181	100	0,49	0,049	0,049	2,2	0,98
C_4	32,86	35,80	33,78	39,4119	100	0,62	0,062	0,062	1,8	1,24
$C_4\text{iso}$	31,46	34,72	33,48	42,4210	100	0,65	0,065	0,065	2,0	1,30
C_5	44,36	47,91	45,60	63,1976	100	0,79	0,079	0,079	1,7	1,58
$C_5\text{iso}$	43,05	47,16	44,48	64,5870	100	0,81	0,081	0,081	1,8	1,62
C_6	58,86	62,88	60,87	68,1685	100	0,82	0,082	0,082	1,3	1,64

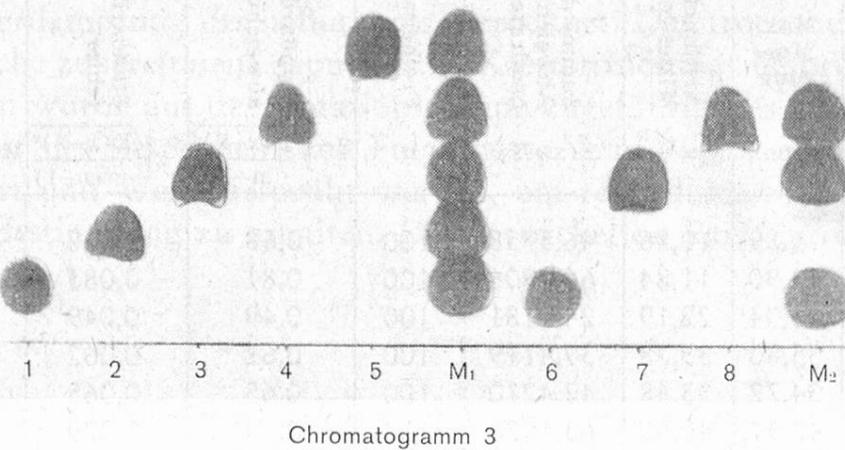
Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch die Chromatogramme der einzelnen Säure-Standardlösungen und deren Mischungen verschiedener Konzentration bestätigt.

Folgende Mengen wurden aufgetragen: 25 μg (Chromatogramm 2), 30 μg , 35 μg , 40 μg und 45 μg (Chromatogramm 3).



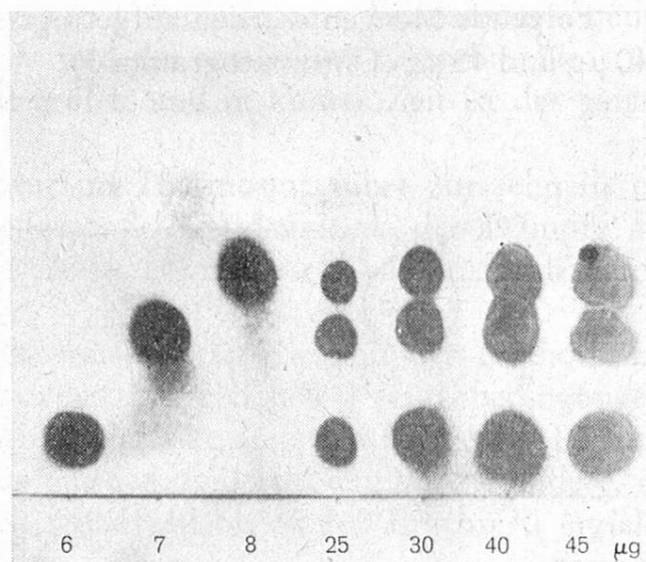
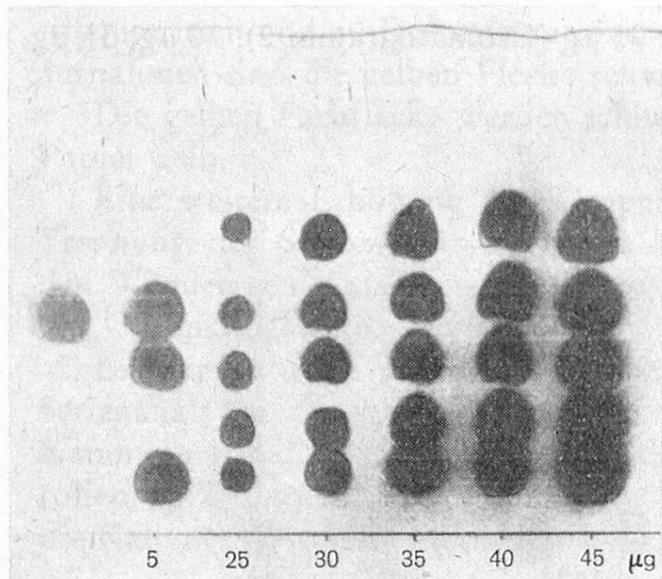
Chromatogramm 2

45 μ g



Quantitative Bestimmung der Säuren C_1 — C_6

Eine Reihe von Standard-Lösungen einer Mischung der flüchtigen Fettsäuren wurde durch Verdünnung der Stammlösung so vorbereitet, daß 1 ml der Lösung 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg einer jeden Säure enthielt, was auf die aufgetragenen 5 μ l Säuremenge umgerechnet 25, 30, 35, 40, 45 μ g betrug. Dieses wurde bei den unten abgebildeten Chromatogrammen gekennzeichnet.



Der Farbfleckvergleich zeigt deutliche Größenveränderung welche von der aufgetragenen Säuremenge abhängig ist. Um die beobachteten Effekte zahlenmäßig und statistisch zu erfassen, wurden über 50 Chromatogramme von Säuremischungen verschiedener Konzentration (25, 30, 35, 40 und 45 μ g) angefertigt. Es wurden über 2000 Bestimmungen durchgeführt, die der statistischen Ana-

lyse (45) durch Bestimmung der Standard-Abweichung unterworfen wurden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Diagramm 1 zeigt das Verhältnis von Fleckfläche in mm^2 zum Konzentrationslogarithmus (23, 24, 25, 31, 36).

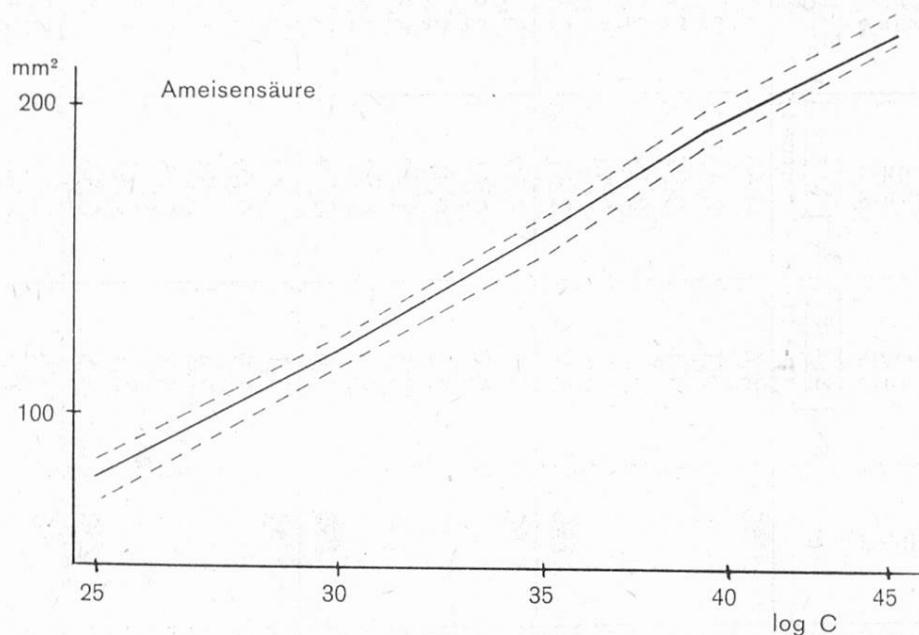
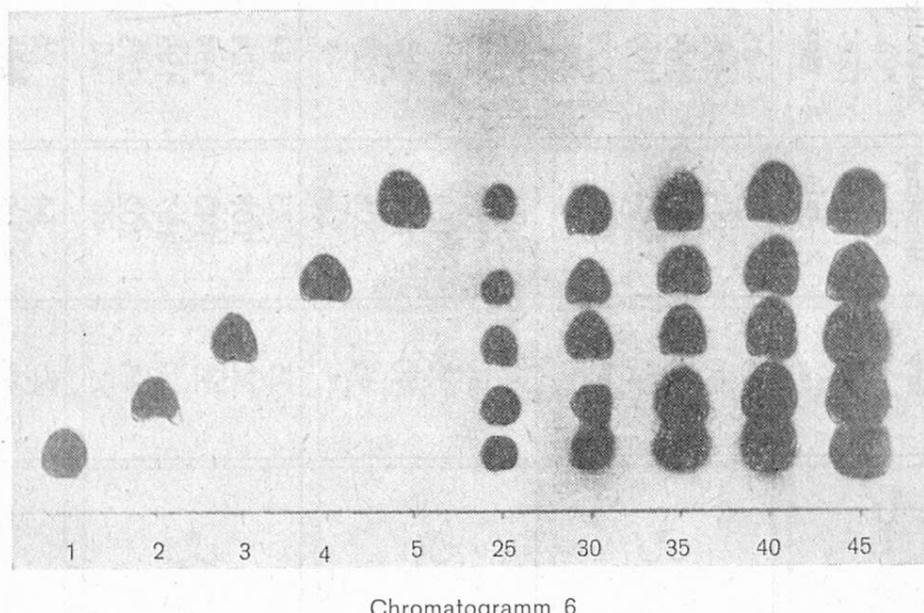


Diagramm 1

Entsprechend ähnliche Diagramme wurden für folgende Säuren aufgenommen: Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter-, Isobutter-, Valerian-, Isovalerian- und Capronsäure.

Wie bei der Identifikation der Säuren wurden die Ergebnisse durch Chromatogramme der einzelnen Säure-Standard-Lösungen und deren Mischungen von verschiedener Konzentration bestätigt.



Chromatogramm 6

Tabelle 3 Statistische Auswertung der quantitativen Bestimmungen

Säure	Menge in g	Min. Messung	Max. Messung	Arithmetisches Mittelwert $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$	Summe der Abweichungsquadrat e	Freiheitsgrad	Standardabweichung $S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$	Standardfehler $S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$	Variabilitätskoeffizient $V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \%$	Bestimmungspräzision $2s$
C_1	25	71	85	79	1045	50	4,6	0,65	5,8	9,2
	30	115	125	121	462		3,1	0,43	2,5	6,2
	35	152	165	160	826		4,1	0,57	2,6	8,2
	40	185	197	191	850		4,2	0,58	2,2	8,4
	45	219	229	221	288		2,5	0,34	1,1	5,0
C_2	25	71	86	79	877	50	4,2	0,59	5,3	8,4
	30	114	123	122	649		3,6	0,51	2,9	7,2
	35	155	169	160	601		3,3	0,48	2,1	6,6
	40	185	207	188	5396		10,5	1,47	5,5	21,0
	45	208	227	218	1995		6,4	0,89	2,9	12,8
C_3	25	73	84	78	464	50	3,1	0,43	3,9	6,2
	30	108	124	116	1185		3,9	0,69	3,3	7,8
	35	143	154	148	292		2,4	0,34	1,6	4,8
	40	167	185	178	1398		5,3	0,75	3,0	10,6
	45	202	213	207	461		3,1	0,43	1,5	6,2
C_4	25	64	76	68	767	50	3,9	0,55	5,7	7,8
	30	98	112	107	1225		5,0	0,70	4,7	10,0
	35	131	146	141	931		4,3	0,61	3,0	8,6
	40	166	175	169	398		2,7	0,39	1,6	3,4
	45	185	210	193	2945		7,7	1,08	4,0	15,4
						250	4,7	0,66	3,8	9,4

C ₄ iso	25	68	79	73	861	50	4,2	0,58	5,7	8,4
	30	105	116	110	410		2,9	0,40	2,6	3,8
	35	132	146	142	716		3,8	0,55	2,7	7,6
	40	163	174	169	192		4,0	0,56	2,4	8,0
	45	187	200	195	1053	250	4,6	0,65	2,4	9,2
C ₅	25	60	70	63	342	50	2,6	0,35	4,1	5,2
	30	98	108	102	573		3,4	0,47	3,3	6,8
	35	130	142	134	329		2,6	0,36	2,0	5,2
	40	160	171	165	806		4,1	0,56	2,5	8,2
	45	185	195	188	310	250	2,5	0,35	1,3	5,0
C ₅ iso	25	61	72	64	159	50	1,8	0,25	1,1	2,6
	30	100	111	106	418		2,9	0,41	2,7	5,8
	35	135	145	140	504		3,2	0,45	2,3	6,4
	40	160	176	171	942		4,4	0,61	2,6	8,8
	45	190	203	197	731	250	4,0	0,54	2,0	8,0
C ₆	25	55	64	59	310	50	2,6	0,35	4,4	5,2
	30	95	117	101	2381		6,9	0,93	6,8	13,8
	35	136	141	138	98		1,4	0,19	1,0	2,8
	40	165	178	169	707		3,6	0,53	2,1	7,2
	45	190	199	195	451	250	3,0	0,42	1,5	6,0
C ₁ —C ₆	25	55	86	70	4825	400	3,4	0,47	4,5	6,8
	30	95	125	111	7303		4,0	0,57	3,6	8,0
	35	130	169	145	4297		3,1	0,44	2,1	6,2
	40	160	207	175	11289		4,8	0,68	2,7	9,6
	45	185	229	202	8234	2000	4,2	0,60	2,1	8,4

Die Absonderung der freien, niedrigen, flüchtigen Fettsäuren aus dem Fischfleischgewebe

Die nächste Arbeitsstufe bestand in der Ausarbeitung einer Absonderungsmethode der niedrigen flüchtigen Fettsäuren aus dem Fischfleischgewebe. Die Absonderung dieser Säuren aus biologischem Material ist mit vielen Schwierigkeiten verbunden. Am häufigsten wird die Wasserdampfdestillation aus saurem Medium angewandt (8, 15, 25, 26, 31, 34, 37, 38, 40, 42, 46, 47, 48, 49, 50). Cawler (27), De Costa und andere (51) wandten eine Destillation mit verminderterem Druck an. Eigene Versuche zeigten ebenfalls große Schwierigkeiten bei der unter verminderterem Druck geführten Destillation der flüchtigen Fettsäuren aus dem Fischfleischgewebe. Die Lösungen neigten zur starken Schaumbildung, die eine schnelle und wirksame Destillation völlig verhinderte. Ein Zusatz von Stearinsäure gab keine positiven Resultate. Die Schwierigkeiten der vollständigen quantitativen Destillation der flüchtigen Säuren bestätigten auch Janicki (25), Eschmann (52) und Schweppe (53). Von ausschlaggebender Bedeutung sind hier die Wasserdampf-Durchflußgeschwindigkeit sowie der Dampfdruck über der destillierten Flüssigkeit, Parameter, die in der Laboratoriumspraxis unverändert schwer zu erreichen sind. Darum ist eine Standard-Apparatur und die genaue Einhaltung aller Destillationsbedingungen sowie bei sehr kleinen Säuremengen in biologischem Material die Destillation in Gegenwart neutraler Gase unerlässlich (36, 49).

Der Auswahl einer geeigneten Absonderungsmethode wegen wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, in denen die zugesetzten Säuren C₂—C₆ (ohne Iso-Form) in besonders vorbereitete Fischfleischgewebe ermittelt wurden. Zu diesem Zwecke wurde das Fischfleisch von frischen Schleien (*Tinca vulgaris*) in einer Fleischmaschine zerkleinert, auf ein Sieb gebracht und einige Stunden mit fließendem Wasser gespült. Nach der Spülung wurde das zerkleinerte und gespülte Fischfleisch gut ausgedrückt und in Portionen zu 100 g aufgeteilt. Zu jeder Portion wurde 1 ml 0,8%ige Säurelösung der Säuren C₂—C₆ zugegeben, gut vermischt und der Reihe nach mittels Wasserdampfdestillation, Wasserextraktion sowie Extraktion mit organischen Lösungsmitteln der Säuregehalt bestimmt.

Bei der Dampfdestillation wurde mit Phosphorsäure bis zum pH = 2 oder mit der Mischung von Osteux (37) angesäuert. Das in 30 Minuten aufgefangene Destillat in der Menge von 400 ml wurde mit Morpholin bis zum pH = 9 alkalisiert und auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml 50%igem Alkohol gelöst und chromatographiert.

Die Wasserextraktion wurde in einem 1000 ml Meßkolben, in den die Mischung gebracht und mit Wasser aufgefüllt wurde, durchgeführt. Nach kräftigem Schütteln ließ man bis zur Trennung der wässrigen Schicht absetzen. Da die genaue Abtrennung der wässrigen Schicht vom Satz schwer zu erreichen war, wurde eine Zentrifuge angewandt. Die erhaltene Lösung wurde mit Morpholin auf pH = 9 alkalisiert und auf dem Wasserbad abgedampft. Der schmierige Rückstand wurde in 50%igem Alkohol gelöst und die erhaltene trübe Lösung erneut zentrifugiert.

Beim Chromatographieren einiger Tropfen der klaren Flüssigkeit wurden keine positiven Resultate erhalten.

Die Butanol-Extraktion wurde nach den Arbeiten von *Hiscox* und *Marrison* (40), sowie *Lindquist, Storgårds* und *Cäranson* (36) durchgeführt, jedoch auch in diesem Falle wurden keine positiven Ergebnisse erzielt.

Die Aethanol-Extraktion wurde nach *Hughes* (10) und die Aether-Extraktion auf folgende Weise durchgeführt: 100 g einer vorbereiteten Mischung wurden in einem Homogenisator mit Aethyläther extrahiert, die gesammelten Extrakte in einen Scheidetrichter gebracht, 25 ml 5%iger NaOH zugegeben und ausgeschüttelt. Die untere alkalische Schicht wurde nach der Trennung in den nächsten Scheidetrichter gebracht. Die Aetherschicht wurde wiederholt mit 25 ml Wasser ausgeschüttelt und die wäßrige Schicht zu der alkalischen zugegeben. Diese Lösung wurde dann in einem Scheidetrichter mit Schwefelsäure (1 : 4) angesäuert und mit Aether extrahiert, der Aetherextrakt mit 10 ml einer 10%igen Morpholinlösung ausgeschüttelt und die wäßrige Schicht in einer Abdampfschale bei 50 °C und pH-Kontrolle abgedampft, der Trockenrückstand in 1 ml 50%igem Aethanol gelöst und chromatographiert.

Die Benzin- und Petrolätherextraktion erfolgte auf gleiche Weise. Alle Extraktionsstufen wurden auf Anwesenheit der flüchtigen Säuren kontrolliert.

Zur Feststellung eventueller Säuremengen im angewandten und gespülten Fischfleisch wurden Blindproben ohne Säurezusatz durchgeführt. Auch die Extraktionsmittel wurden auf den Säuregehalt geprüft. Es wurden jedoch in ihnen keine C₁—C₆ Säuren gefunden. Die Ergebnisse der wiedergefundenen Säuren mittels verschiedener Extraktionsmethoden (Tabelle 4) zeigen mit Rücksicht auf die guten Ergebnisse (79 % Wiedergewinn), Zeit- und Reagenziensparnis, das die Benzinextraktion am besten befriedigt.

Das Auftreten der C₁—C₆ Säuren in frischen und verdorbenen Fischen

Nachdem die Methode der Absonderung der C₁—C₆ Säuren aus dem Fischfleischgewebe, ihre Identifikation und quantitative Bestimmung bearbeitet war, wurde das Auftreten dieser Säuren in frischem und verdorbenem Fischfleisch untersucht. Die Untersuchungen wurden mit 4 Fischarten unternommen: Brassen (*Abramis brama*), Schleien (*Tinca vulgaris*), Hechten (*Esox lucius*) und Aalen (*Anguilla vulgaris*). Gesamthaft wurden über 110 Fischproben untersucht. Zu den Untersuchungen wurden große Exemplare angewandt, so daß nach dem Entgräten und Zerkleinern ungefähr 800 g erhalten wurden. Die Untersuchungen umfaßten: a) fangfrische Fische; b) 24 Stunden bei 20 °C aufbewahrte Fische mit leichten organoleptischen Veränderungen; c) 48 Stunden bei 20 °C aufbewahrte Fische mit deutlichen organoleptischen Veränderungen; d) weitere 24 Stunden bei gleicher Temperatur aufbewahrte Fische bis zum Auftreten von starken Fäulnisveränderungen. Die organoleptische Beurteilung wurde von 3—4 Personen nach

Tabelle 4 Die Säurerückgewinnung in den angewandten

	Destillation + H ₃ PO ₄					Destillation + Säuremischung					Alkohol-extraktion	
	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₂	C ₃
X	20,15	17,75	12,65	—	—	15,95	12,65	17,35	14,50	—	20,15	20,75
	—	—	—	—	—	21,75	15,25	11,90	12,75	14,25	21,25	23,25
	10,75	21,10	20,25	18,75	12,75	—	—	—	—	—	18,75	19,55
	15,65	—	—	—	—	14,55	19,25	—	—	—	20,75	18,25
	18,75	12,25	—	—	—	18,75	14,65	15,80	13,25	—	24,25	25,75
	—	—	—	—	—	12,75	13,45	12,65	12,65	18,25	25,25	21,75
	20,55	13,65	15,90	17,65	20,15	15,85	12,50	14,75	21,10	15,00	20,25	23,15
	12,75	15,75	15,75	20,00	13,65	13,25	17,35	20,85	14,25	12,10	20,15	22,85
	16,65	—	13,65	12,15	—	20,25	21,10	12,75	—	—	19,65	24,75
	14,85	20,15	18,85	15,90	14,90	12,65	14,80	13,75	12,85	19,75	18,75	23,75
\bar{X}	13,01	10,06	9,70	8,44	6,14	14,57	14,10	11,98	10,13	7,93	20,92	22,37
$\%$	32,5	21,5	24,2	21,1	15,3	36,4	35,2	29,9	25,3	19,8	52,3	55,9
X min. $\%$ —												
X max. $\%$ —	0 — 52,8 $\%$					0 — 54,4 $\%$						
$\bar{X} \%$	9,47 = 25,8 $\%$					11,74 = 29,3 $\%$						

allgemein angewandten organoleptischen Untersuchungsmethoden frischer Fische (1), sowie nach den polnischen Normen für:

Brassen — RN — 55 — M. Ž. — 09108
 Schleie — RN — 55 — M. Ž. — 09116
 Hechte — RN — 55 — M. Ž. — 09114
 Aale — RN — 55 — M. Ž. — 04534, durchgeführt.

Nach der Bestimmung der organoleptischen Eigenschaften wurde der Fisch gereinigt, entköpft, ausgeschlachtet und entgrätet. Die erhaltenen Fischfilets wurden im Homogenisator zu einer einheitlichen Masse zerkleinert. In dem so vorbereiteten Versuchsmaterial wurde der Wasser- und Fettgehalt, Säuregrad des Fettes, Säuregrad des Destillates, Gehalt der im Wasserdampf flüchtigen Stickstoffbasen und des Ammoniaks, sowie der Säuregrad des Wasserextraktes bestimmt. Mit Rücksicht auf den schnellen Verderb des zerkleinerten Materials war es notwendig, eine Reihe von Untersuchungen gleichzeitig auszuführen.

Der Wassergehalt wurde nach der Methodik der polnischen Normen PN — 56/A — 52110 bestimmt. Der Fettgehalt, sein Säuregrad, sowie der Säuregrad des Wasserextraktes wurden nach der Methode von *Krauze, Bozyk und PiekarSKI* (56) bestimmt. Den Gesamtgehalt der mit Wasserdampf flüchtigen Säuren bestimmt man nach der Methode von *Wierzchowski und Severin* (16), den

Methoden (Anfangsmengen 40 µg)

Alkohol- etraktion			Aetherextraktion						Benzinextraktion (Petroläther)				
C ₄	C ₅	C ₆	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	
18,15	20,10	21,10	28,75	31,75	33,10	34,75	31,10	32,05	31,52	31,52	27,75	27,75	
22,25	24,25	25,10	33,65	34,75	28,25	30,25	34,25	30,50	31,00	32,00	28,25	31,25	
24,25	18,25	24,75	33,25	28,25	34,10	31,75	32,25	33,65	30,05	35,10	31,52	33,10	
22,75	21,90	22,75	32,75	31,10	30,25	28,25	30,10	32,00	28,90	28,25	32,75	32,75	
19,65	22,25	26,10	31,10	34,25	27,25	32,10	30,75	35,10	33,75	30,25	30,05	32,25	
23,65	22,35	21,10	30,25	30,25	30,25	33,25	31,25	28,90	32,25	31,05	33,10	33,75	
20,55	25,85	25,10	32,75	32,75	35,75	32,25	33,25	32,55	31,25	33,10	32,25	28,25	
23,85	23,75	22,25	33,75	30,75	28,75	35,25	28,25	31,25	33,10	32,75	33,10	30,10	
24,65	23,65	23,75	32,25	32,65	33,25	30,10	35,10	33,10	32,75	30,50	30,50	30,50	
22,75	20,75	24,00	34,25	31,25	32,75	26,75	33,75	32,75	33,75	31,00	32,25	32,75	
22,26	22,31	23,60	32,25	31,77	31,77	31,67	32,00	32,18	31,83	31,45	31,15	31,24	
55,6	55,8	50,0	80,6	79,4	78,4	79,2	80,0	80,4	79,6	78,6	77,8	78,1	
45,6 %—65,2 %			70,6 %—89,4 %						70,6 %—87,8 %				
22,29 = 55,7 %			31,81 = 79,5 %						31,77 = 79,4 %				

Gehalt der freien Stickstoffbasen nach der Methode von *Wierzchowski* und *Nowak* (57) und die quantitative Ammoniakbestimmung wurde nach der Methode von *Wierzchowski*, *Borowik* und *Severin* (58) in der Modifikation von *Podeszewski* und *Kołakowski* (41) ausgeführt.

Die Bestimmung der flüchtigen niedrigen Fettsäuren C₁—C₆ wurde nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Es wurden 10 parallele Bestimmungen mit einer Probe ausgeführt und dann die Fläche der erhaltenen und entwickelten Farbflecke der Säuren berechnet. Die Säurekonzentration wurde aus den Diagrammen abgelesen. Die erhaltenen Werte sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt und aus den Chromatogrammen 7—9 zu ersehen. Da es mit der ausgearbeiteten Methode nicht gelungen war, die Ameisensäure von der Essigsäure und die Iso-Form der Butter- und Valeriansäure von ihren n-Formen zu trennen, wurde die Ameisensäure- und Essigsäure-Fraktion als Essigsäure und die Iso- und n-Form als n-Buttersäure und n-Valeriansäure bezeichnet.

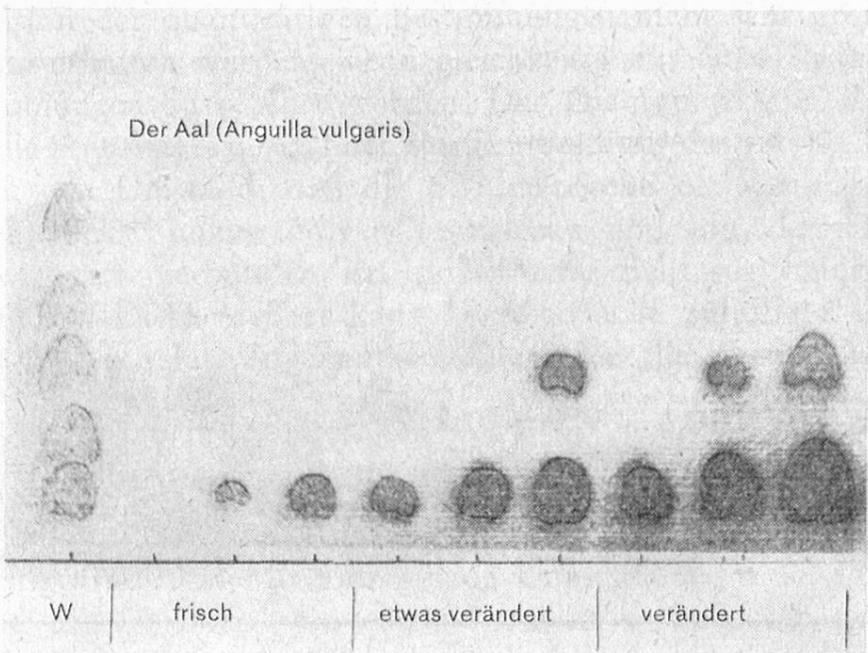
Diskussion der Ergebnisse

Der ausgearbeitete chromatographische Analysengang ergab im Vergleich zu den Angaben der Fachliteratur eine bedeutende Zeitsparnis bei der Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren C₁—C₆. Der Zeitaufwand der Analyse einer Probe mit gleichzeitiger Ausführung von 10 Bestimmungen betrug ungefähr 2 Stunden. Bei 10 Serienuntersuchungen mit einer Bestimmung in jeder Probe beträgt der Zeitaufwand 3—4 Stunden.

Tabelle 5 Zusammenstellung der chemischen Kennzahlen

Säuremenge in mg ^{0/0}	Auswertung des untersuchten Versuchsmaterials	Fischart	Brasse Abramis brama				Schleie Tinea vulgaris			Hecht Esox luciux			Aal Anguilla vulgaris		
			frisch	etwas verändert	verändert	verdorben	frisch	etwas verändert	verändert	frisch	etwas verändert	verändert	frisch	etwas verändert	verändert
Wasser in %			75	75	75	1,12	79	79	79	79	79	79	49	50	50
Fett in %			1,03	1,04	1,07		1,55	1,73	1,72	0,56	0,48	0,53	31,6	31,5	31,7
Säuregrad des Fettes in ml 0,01 n NaOH/100 g			12,73	18,82	23,05	30,90	9,55	13,63	19,80	4,76	6,38	13,58	5,3	18,3	30,1
Wasserdampfflüchtige Säuren in ml 0,01 n NaOH/100 g			50,62	59,28	64,13	77,9	55,25	71,04	77,98	49,45	61,76	85,09	25,2	34,6	47,9
Ammoniak in mg ^{0/0}			11,42	16,68	24,02	71,10	34,45	58,77	58,33	57,64	62,12	79,35			
Säuregrad des Wasserauszuges in ml 0,01 n NaOH/100g			8,22	9,41	10,75	12,18	6,45	7,08	7,81	6,80	7,40	11,04			
Essigsäure (Fraktion C ₁ —C ₂)			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
Propionsäure			4,99	5,41	7,12	10,31	4,43	5,42	8,32	5,12	5,66	7,71	3,52	5,70	9,62
Buttersäure			—	—	—	—	5,08	—	—	—	—	—	—	—	—
Valeriansäure			—	—	—	—	6,84	—	1,71	2,45	—	1,28	1,95	1,75	3,83
Capronsäure			—	—	—	—	5,09	—	—	—	—	—	—	—	—
Zusammen (Fraktion C ₁ —C ₆)			4,99	6,74	9,47	29,37	4,43	7,13	10,77	5,12	6,94	9,66	3,52	7,45	13,45

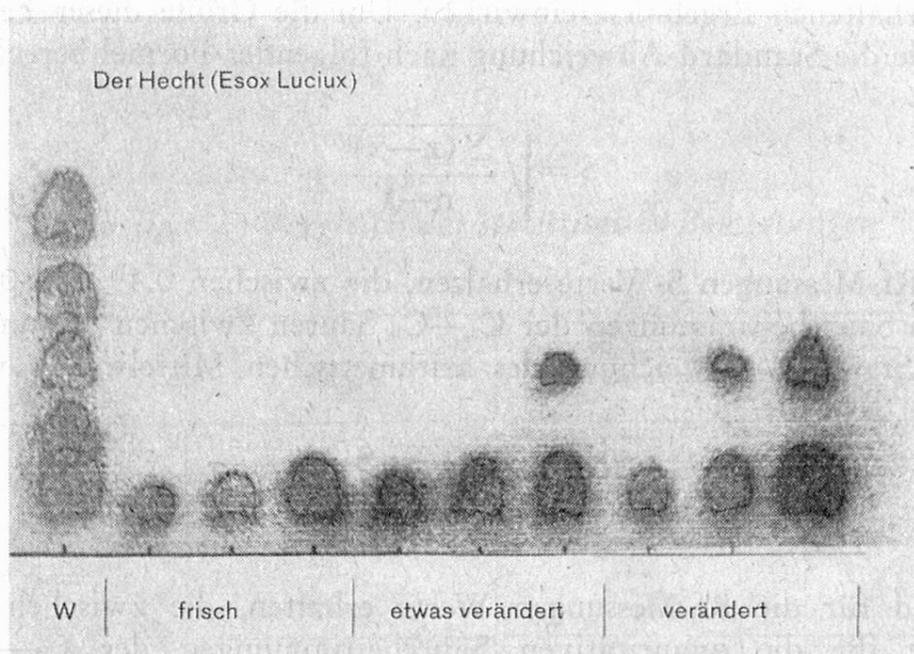
Der Aal (*Anguilla vulgaris*)



Chromatogramm 7

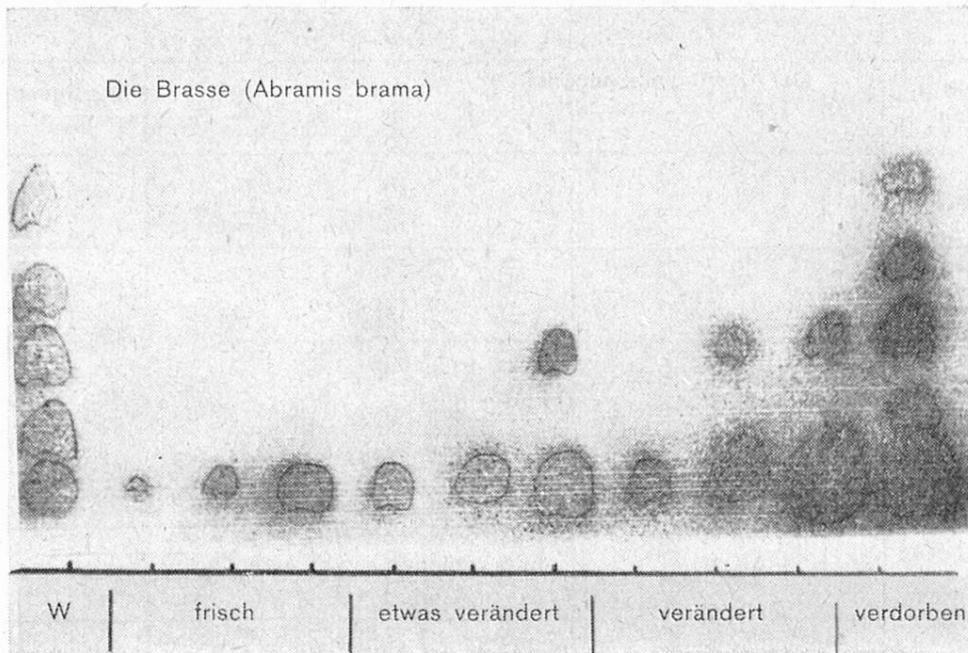
(bei Schleie *Tinca vulgaris* erhält man ein fast gleiches Chromatogramm)

Der Hecht (*Esox Luciux*)



Chromatogramm 8

Die Ergebnisse der durchgeföhrten Standard-Untersuchungen wurden der statistischen Analyse unterworfen und die Werte in den Tabellen 2 und 3 zusammengefaßt. Festzustellen war, ob die ausgearbeitete Methode keine großen systematischen Fehler aufzuweisen hat und in welchem Maße die zufälligen Feh-



Chromatogramm 9

ler auf die erhaltenen Ergebnisse einwirken. Um die Größe dieser Fehler zu bewerten, wurde die Standard-Abweichung nach folgender Formel berechnet:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

und für die Rf-Messungen S-Werte erhalten, die zwischen 0,49 und 0,82, für die quantitativen Säurebestimmungen der C₁—C₆ Säuren zwischen 3,0 und 5,6 oszillierten. Die Standard-Abweichung des arithmetischen Mittelwertes wurde nach der Formel

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{n}$$

errechnet und für die Rf-Messungen Werte erhalten, die zwischen 0,049 und 0,082, sowie für die quantitativen Säurebestimmungen der C₁—C₆ Säuren zwischen 0,42 und 0,79 oszillierten. Hieraus geht hervor, daß die ausgearbeitete Methode mit keinem wesentlichen systematischen Fehler belastet ist. Dies bestätigen auch die für die quantitativen Bestimmungen angefertigten Diagramme, in denen die Kurven der Mittelwerte als Gerade mit unmerklicher Abweichung dargestellt sind.

Die Bestimmungspräzision beträgt für die Rf-Werte $2S = 0,98—1,64$ und ist als sehr hoch anzusehen, im Gegensatz zu den quantitativen Bestimmungen der einzelnen Säuren mit $2S = 6,0—11,2$, im Mittel 8,0. Dies ist ein Beweis dafür,

daß die Präzision der quantitativen Bestimmungen nicht sehr groß ist und daß gute Ergebnisse erhalten werden, wenn gleichzeitig mit einer Probe eine größere Anzahl Bestimmungen ausgeführt werden. Das Diagramm 1, in dem mit gestrichelter Linie die Streuwerte bezeichnet wurden, bestätigt das.

Wenn man den Umstand, daß die planimetrische Auswertung mit der Umzeichnung der höchst unbeständigen Farbflecke und mit der Flächenmessung auf Millimeterpapier verbunden ist in Betracht zieht, erscheinen die Fehlergrenzen begründet. Diese Meßart kann auch Ursache zufälliger Fehler werden. Die Berechnung des relativen Standardfehlers für die einzelnen quantitativen

Bestimmungen $V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} = 2,1 - 3,8$, im Mittel $V = 3,0 \%$, gibt Anlaß zur Feststellung, daß die ausgearbeitete Methode der chromatographischen Bestimmung der $C_1 - C_6$ Säuren für die Voraussetzung dieser Arbeit ausreichend ist.

Mit der ausgearbeiteten Methode gelang es nicht, die Ameisensäure von der Essigsäure und die Iso-Form von der n-Form zu trennen. In den Ergebnissen wurde also nur Essigsäure angegeben, was als Fraktion der Ameisen- und Essigsäure anzusehen ist. Genau wie die Butter- und Valeriansäure als Fraktion der Iso- und n-Form anzusehen ist.

Die Ergebnisse der statistischen Bewertung der eigenen Methoden wurden mit der von *Manganelli* und *Brofazi* (34) durchgeföhrten verglichen und in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6 Vergleich der statistischen Bewertungen

	Säure	Manganelli und Brofazi (34)	Eigene Untersuchungen
$S_x = \frac{S}{\sqrt{n}}$	C_2	0,35	0,79
	C_3	0,91	0,53
	C_4	0,50	0,66
	C_5	2,12	0,42
	C_6	0,94	0,48
	Mittelwerte	0,96	0,58
$V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \%$	C_2	2,7	3,7
	C_3	7,0	2,6
	C_4	3,9	3,8
	C_5	11,8	2,6
	C_6	6,5	3,2
	Mittelwerte	6,4	3,2

Die erhaltenen Werte geben Anlaß zur Behauptung, daß die in der Arbeit angewandte Methode der C_2 — C_6 Säurebestimmung weit bessere und zufriedenstellendere Ergebnisse liefert.

Eine gewisse Schwierigkeit ist die Notwendigkeit der Anwendung ziemlich konzentrierter Lösungen zu den chromatographischen Bestimmungen. Die durchgeführten Versuche zeigten, daß zu den quantitativen Bestimmungen Säurelösungen von niedrigerer Konzentration als 0,1 % nicht angewendet werden können. Es ist daher nötig, größere Mengen des Versuchsmaterials und der Lösungsmittel am Versuchsanfang, sowie einen Arbeitsgang anzuwenden, der aus großen Extraktmengen kleine Flüssigkeitsmengen von genügender Konzentration ergibt.

Die mit Benzin und Petroläther durchgeführten Extraktionsversuche der flüchtigen Säuren aus dem Fischfleischgewebe konnten einen Rückgewinn von durchschnittlich 79 %, bei Schwankungen von 70—88 %, aufweisen. Auch hier können Schwierigkeiten auftreten, indem bei der Extraktion andere im Fisch auftretende Substanzen mitextrahiert werden. Diese Schwierigkeiten können mittels der ausgearbeiteten Methode, mit dem Lösungsmittel und pH-Wechsel, sowie der Verminderung der angewandten Flüssigkeitsmengen behoben werden.

Bei der Diskussion der Ergebnisse von Fischanalysen verschiedener Frischegrade sei betont, daß im zugänglichen Schrifttum Arbeiten über die Anwendung dieser Säurebestimmungen zur Frischebeurteilung von Süßwasserfischen nicht gefunden wurden. Nur einige Arbeiten behandeln die Bestimmung dieser Säuren in Seefischen. Die in der Tabelle 5 zusammengefaßten eigenen Untersuchungen zeigen ein Anwachsen der Säuremenge im Verlaufe des Verderbs. In dem Gewebe frischer Fische wird eine Essigsäuremenge gefunden, die mit dem Frischeabfall wächst. In der Brasse wurden z. B. folgende Werte gefunden: in organoleptisch einwandfreiem Fisch 4,99 mg %, bei leicht veränderten Merkmalen 5,41 mg %, bei deutlichen Veränderungen 7,12 mg % und beim Fäulniszerfall 10,31 mg %. Auch Buttersäure erscheint als Zerfallsprodukt in steigender Menge. Wie bei der Essigsäure fand man in der Brasse folgende Buttersäuremengen: bei leichten organoleptischen Veränderungen 1,33 mg %, bei deutlicher Veränderung 2,35 mg % und im Zerfallsstadium 6,84 mg %. In den im Zerfall befindenden Fischen wurden außerdem weitere niedrige, flüchtige Fettsäuren wie z. B. Propionsäure, Valeriansäure und Capronsäure gefunden.

Die von uns bei Süßwasserfischen gefundenen Werte stimmen mit den von *Uchiyama, Yokoyama* (12), *Hillig* (54) und *Hughes* (10) bei Seefischen gefundenen überein, widersprechen aber teilweise den Ergebnissen von *Suzuki* (3, 14). Dieser Widerspruch betrifft allerdings nur das Auftreten der Essigsäure in frischem Material, nicht aber die Steigerung der Säuremengen beim Frischeabfall, die mit den unsrigen übereinstimmt. Der Vergleich des Verhältnisses von Säuremenge und Fettgehalt zeigt, daß die Säuremenge in mageren Fischen sich anders gestaltet als bei fettreichen. Dieser Zusammenhang ist in dem Diagramm 2 dargestellt.

Aus dem Diagramm ist zu ersehen, daß die Säuremenge beim Verderb fettreicher Fische schneller wächst als bei fettarmen Fischen. Ähnliche Beobachtun-

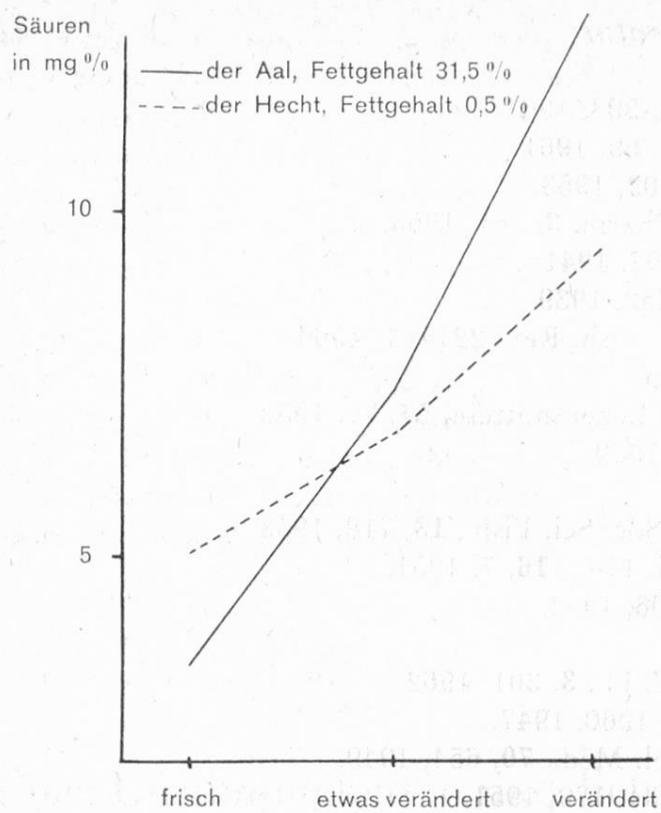


Diagramm 2

gen machten *Wierzchowski* und *Severin* (4) bei der Aciditätsbestimmung des Destilates von Heringen von verschiedenem Fettgehalt.

In der Tabelle 5 sind außer den Bestimmungswerten der flüchtigen Fettsäuren einige bei der Frischebeurteilung der Fische oft angewandte chemische Kennzahlen angeführt. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die richtige Frischebeurteilung frischer Fische einige Schwierigkeiten bereiten kann. Auch die quantitative Essigsäurebestimmung löst dieses Problem nicht. In zweifelhaften Fällen ist aber der Buttersäurenachweis ein genügender Beweis für die schlechte Qualität des Fischfleisches und für die negative Bewertung ausreichend.

Zusammenfassung

Die chromatographische Bestimmungsmethode der flüchtigen, niedrigen Fettsäuren wurde modifiziert, indem sie bedeutend vereinfacht wurde, was eine Zeitersparnis zur Folge hatte. Die Methode eignet sich zur Identifikation der flüchtigen Säuren mittels Rf-Bestimmung mit einer Präzision von durchschnittlich $2S = 1,13$, sowie zur quantitativen (planimetrischen) Bestimmung dieser Säuren mit einer Präzision von $2S = 8,0$. In zweifelhaften Fällen, wo die Genußtauglichkeit mit chemischen Untersuchungen nicht einwandfrei festzustellen ist, kann der schnelle chromatographische Buttersäurenachweis eine zur negativen Bewertung ausreichende Grundlage sein.

Résumé

Description d'une nouvelle méthode, plus simple et plus rapide, de dosage des acides gras volatils des poissons par chromatographie sur papier.

Dans les cas douteux dans lesquels les méthodes chimiques ne permettent pas de se rendre de façon certaine si le poisson est propre à la consommation la détection chromatographique rapide de l'acide butyrique peut être une base suffisante pour une appréciation négative.

Summary

Description of a novel, simpler and quicker paper chromatographic method for the determination of the volatile fatty acids of fish.

Literatur

1. Jaquot R., Carrilho O.: Rev. Conserve, **3**, 203, 1961.
1. Jaquot R., Carrilho O.: Rev. Conserve, **7**, 69, 1961.
3. Suzuki T.: Bull. Jap. Soc. Sic. Fish., **19**, 102, 1953.
4. Wierzchowski J., Severin M.: Acta Pol. Pharm. **3**, 161, 1953.
5. Collins V. K.: J. Fish. Res. Bd. Can., **5**, 197, 1941
6. Watson D. W.: J. Fish Res. Bd. Can., **4**, 252, 1939.
7. Collins J., Seagran H., Iverson J.: Comm. Fish. Rev, 2214, 1, 1960.
8. Ritter W.: Milchwissenschaft, **4**, 122, 1955.
9. Hirsch P.: Chemische Konservierung von Lebensmitteln, **54**, 77, 1952.
10. Hughes R. B.: J. Sci. Food Agric., **11**, 47, 1960.
11. Charuley F.: Analyst, **70**, 168, 1945.
12. Uchiyama H., Yokoyama W.: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **18**, 718, 1953.
13. Amano K., Tomiya F.: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **16**, 7, 1951.
14. Suzuki T.: Bull. Jap. Soc. Sic. Fish., **19**, 106, 1953.
15. Hillig F.: J. A. O. A. C., **4**, 927, 1954.
16. Wierzchowski J., Severin M.: Roczn. P. Z. H., **3**, 301, 1962.
17. Lugg J. W. H., Owerell B. T.: Nature, **87**, 1960, 1947.
18. Fink K., Fink R. H.: Proc. Soc. Expt. Biol. Med., **70**, 654, 1949.
19. Thompson A. R.: Australian J. Sci. Res., **34**, 180, 1951.
20. Aleksandrowicz J.: Med. Dośw. Mikrobiol. **11**, 19, 1959.
21. Brown F.: Biochem. J., **47**, 598, 1950.
22. Brown F., Hall L. P.: Nature, **166**, 66, 1950.
23. Drews E.: Getreide und Mehl. **11**, 85, 1953; **12**, 90, 1953.
24. Duncan R. E. B., Porteons J. W.: Analyst, **78**, 641, 1953.
25. Janicki J., Niewiarowicz A., Skorupski M.: Przem. Chem. **8**, 417, 1954.
26. Schwartzman J.: J. A. O. A. C., **43**, 428, 1960.
27. Cawler J. H.: J. Sci. Food Agric. **1**, 57, 1962.
28. Isherwood E. A., Hanes C. G.: Biochem. J., **55**, 827, 1953.
29. Kennedy E. P., Barber H. A.: Anal. Chem., **23**, 1033, 1951.
30. Rentschler H., Tanner H.: diese Mitt. **45**, 142, 1954.
31. Reid R. L., Lederer M.: Biochem. J., **50**, 60, 1951.
32. Jones A. R., Dowling E. J., Skraba W. J.: Anal. Chem., **25**, 394, 1953.
33. Long A. G., Anayle J. R., Stedman R. J.: J. Chem. Soc., **2**, 197, 1951.
34. Manganelli R. M., Brofazi F. R.: Anal. Chem., **29**, 1441, 1957.
35. Virtanen A. J., Miettinen J. K.: Nature, **168**, 294, 1951.
36. Linquist B., Storgårds T., Cärransson M.: XIII-th. Intern Dairy Congress, Haga, **3**, 1250, 1953.
37. Osteux R., Guillauma J., Laturaze J.: J. of Chromat., **1**, 70, 1958.
38. Lindquist B., Storgårds T.: Acta Chem. Scand., **7**, 87, 1953.
39. Airan J. W., Josko G. V., Barnelas J., Master R. W. P.: Anal. Chem. **25**, 659, 1953.
40. Hiscox E. R., Marrison J.: J. Dairy Res., **9**, 215, 1938.
41. Podeszewski Z., Kołakowski E.: Med. Wet., **8**, 472, 1952.
42. Buyske D. A., Wilder P., Hobbs M. E.: Anal Chem., **29**, 105, 1957.
43. Perila O.: Acta Chemic. Scand., **9**, 864, 1955.
44. Czerepko K., Tomicka H., Wicik A.: Chem. Anal., **6**, 605, 1961.
45. Szulc St.: Metody statystyczne, P. W. Ekon. W-wa, 1961.
46. Hais I. M., Macek K.: Handbuch der Papierchromatographie, Jena, 238, 1958.

47. Hillig F., Shelton L. R., Longhrey J. M.: J. A. O. A. C., **43**, 433, 1960.
 48. Katayama T.: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **19**, 793, 1953.
 49. Kościkowsky F. V., Dahlberg A. C.: J. Dairy Sci., **29**, 861, 1940.
 50. Mattick L. R., Robinson W. B.: Food Tech., **1**, 30, 1960.
 51. De Costa A. A., Tomiyama T., Stern J. A.: nach Bul. C. L. P. R. Gdynia, **10**, 15, 1956.
 52. Eschmann H.: diese Mitt., **50**, 541, 1959.
 53. Schewepe H.: Red. H. Linskens. Papierchromatographie in der Botanik, Springer-Verlag, Berlin, 83, 1955.
 54. Hillig F.: J. A. O. A. C., **43**, 427, 1960.
 55. Das Sammelwerk 8-th Ed. A. O. A. C., Washington D. C., 1955.
 56. Krauze S., Bożyk Ż., Piekarski L.: Podręcznik laboratoryjny analityka żywnościowego, P. Z. W. L., Warszawa, 1962.
 57. Wierzchowski J., Nowak J.: Roczn. P. Z. H., **4**, 443, 1953.
 58. Wierzchowski J., Borowik J., Severin M.: Roczn. P. Z. H., **3a**, 321, 1953.

Über Unstimmigkeiten und Fehlerquellen bei der Bestimmung der Peroxidzahl und der Oxydationsbereitschaft

Von H. Hadorn und K. Zürcher

Laboratorium des Verbandes Schweiz. Konsumvereine (VSK), Basel

Die Peroxidzahl (POZ) wird seit Jahrzehnten dazu benutzt, um den peroxidisch gebundenen Sauerstoff in Fetten und Ölen zu bestimmen. Sie ist ein Maß für die mehr oder weniger stark fortgeschrittene autoxydative Veränderung der Öle und Fette. Über die Haltbarkeit oder über die Lagerfähigkeit der betreffenden Öle lassen sich aus der Peroxidzahl allein noch keine sicheren Schlüsse ziehen. Je nach dem Frischezustand der Rohöle, oder nach Art der Raffination ist der Gehalt an natürlichen Antioxydantien der Öle und damit ihre Haltbarkeit sehr verschieden. In stark autoxydierten Rohölen oder in Rohölen aus verdorbenen Saaten sind die natürlichen Antioxydantien weitgehend zerstört. Durch entsprechende Raffination gelingt es, aus solchen Rohölen nahezu geschmacklose und peroxidfreie Raffinate herzustellen. Die Haltbarkeit derartiger Produkte ist jedoch begrenzt. Sie neigen viel stärker zu autoxydativer Verderbnis als Öle aus frischen Saaten.

Die Oxydationsbereitschaft und damit die Lagerfähigkeit eines Öles werden nach *Kaufmann* (1) analytisch durch die Dauer der «Induktionsperiode» charakterisiert. Um darüber ein Urteil zu gewinnen, ist man auf die Ergebnisse der «dynamischen» Analyse angewiesen. Diese beruht darauf, daß man von einem Olmuster, das unter bestimmten Bedingungen durch Luftsauerstoff oxydiert wird, in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnimmt und den Verlauf der Oxydation verfolgt, beispielsweise durch Bestimmung der Peroxidzahl.