

- SEN, and J. RØNNEDE, *Acta Neurol. Scand.* **39**, 85 (1963). — 13. GREEN, D. E., S. MII, and P. M. KOHOUT, *J. biol. Chem.* **217**, 551 (1955). — 14. GREEN, D. E. and S. FLEISCHER, in *Metabolism Physiological Significance of Lipids*, Ed.: DAWSON, R. M. C. and D. N. RHODES, pp. 581-618 (London 1964). — 15. GÜTTLER, F. and J. CLAUSEN, *Enzymologia biol. clin.* **8**, 456 (1967). — 16. HAYASHIDA, T. and O. W. PORTMAN, *J. Nutr.* **81**, 103 (1963). — 17. HOLMAN, R. T., *Proc. Fedn. Amer. Soc. exp. Biol.* **23**, 1062 (1964). — 18. HOLMAN, R. T. and H. MOHRHAUER, *Acta chem. Scand.* **17**, 84 (1963). — 19. HEUDKA, F., *Acta histochem.* **19**, 346 (1964). — 20. ITO, T. and R. M. JOHNSON, *J. biol. Chem.* **239**, 3201 (1964). — 21. LOUS, P., C. M. PLUM, and M. SCHOU, *Nord. Med.* **55**, 693 (1956). — 22. MANN, T., *Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*, p. 34 (London 1964). — 23. MEAD, J. F., *J. biol. Chem.* **227**, 1025 (1957). — 24. NEUDOERFER, T. S. and C. H. LEA, *Br. J. Nutr.* **21**, 691 (1967). — 25. RATHBONE, I., *Biochem. J.* **97**, 620 (1965). — 26. SHARMA, S. K., R. T. TALWALKAR, N. K. GARG, and C. R. K. MURTI, *Indian J. Biochem.* **3**, 122 (1966). — 27. SINGER, T. P. and E. B. KEARNEY, *Methods of Biochemical Analysis*. D. GLICK, ed. Vol. 4, p. 307 (London-New York 1965). — 28. SMITH, J. and H. F. DELUCA, *J. Nutr.* **79**, 416 (1963). — 29. SNIPES, R. L. and J. E. SMITHSON, *J. Cell. Biol.* **31**, 162 A (1966). — 30. THOMASSON, H. J., *Int. Z. Vitaminforschg.* **25**, 62 (1953). — 31. TURPEINEN, O. J., *J. Nutr.* **15**, 351 (1938). — 32. VAN DEENEN, L. L. and G. H. DE HAAS, *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 157 (1966). — 33. WIEME, R. J., *Agar-gel Electrophoresis* (Brussels 1959). — 34. WILKINSON, J. H. and W. A. WITHEYCOMBE, *Biochem. J.* **97**, 663 (1965). — 35. ZINKHAM, W. H., A. BLANCO and L. KUCHYK, *Science* **142**, 1303 (1963). — 36. ZITTLE, C. A. and B. ZITTIN, *J. biol. Chem.* **144**, 105 (1942).

Author's address:

Dr. JØRGEN CLAUSEN  
The Neurochemical Institute, DK 1350 Copenhagen (Denmark)

*Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg*

## Die akute und chronische Toxizität der Ameisensäure und ihrer Formiate\*)

Von G. MALORNY

Mit 1 Abbildung und 6 Tabellen

(Eingegangen am 19. Februar 1969)

Ameisensäure und Formiate wurden verschiedentlich schon als Konserverungsstoffe für bestimmte Lebensmittel verwendet. Über ihre akute und chronische Toxizität sowie ihr Verhalten im Stoffwechsel war aber bis jetzt nur wenig Sichereres bekannt.

Im "Eight Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Genf 1965" (1) finden sich über die Wirkungen der Ameisensäure nur spärliche Angaben. Es heißt dort: "Exact LD<sub>50</sub> values are not available." Und an einer anderen Stelle: "Since long-term toxicity studies are lacking, it is not possible to give guidance on an unconditional acceptable daily intake level in man."

\*) Bericht an die Fremdstoffkommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

### 1. Akute Toxizität

Freie Ameisensäure übt auf alle Gewebe, insbesondere auch auf Schleimhäute, einen starken Reiz aus. In der Konservierungstechnik gelangt sie deswegen meist in Form eines ihrer Salze zur Anwendung. Um den Toxizitätsanteil, der auf die freien Wasserstoffionen entfällt, erfassen zu können, haben wir an der weißen Maus die akute Toxizität ( $LD_{50}$ ) sowohl für die reine Ameisensäure als auch für ihre Salze bestimmt. In Tab. 1 sind die  $LD_{50}$ -Angaben nach oraler Applikation und nach intravenöser Injektion zusammengefaßt.

Tab. 1.  $LD_{50}$  für Ameisensäure und ihre Salze (Maus)

Substanz	$LD_{50}$ mg/kg	$LD_{50}$ Range mg/kg	$LD_{50}$ berechnet auf Formiat	Anzahl der Tiere
<i>per os</i>				
Ameisensäure	1,100	1,000– 1,200	1,076	55
Na-Formiat	11,200	9,600–12,800	7,410	45
K-Formiat	5,500	5,000– 6,000	2,950	50
$NH_4$ -Formiat	2,250	2,050– 2,460	1,610	50
Ca-Formiat	1,920	1,280– 2,560	1,330	45
<i>intravenös</i>				
Ameisensäure	145	138–151	142	50
Na-Formiat	807	800–813	534	50
K-Formiat	95	93– 97	51	55
$NH_4$ -Formiat	410	408–412	293	50
Ca-Formiat	154	150–158	107	55

Die höchste Toxizität bei intravenöser Zufuhr besitzt Kaliumformiat, es folgt die freie Ameisensäure und danach Calciumformiat. Am indifferentesten wirkt Natriumformiat; seine Toxizität ist achtmal geringer als die des Kalziumformiat. Als Ursache für diese Unterschiede ist die Eigentoxizität der Kationen anzusehen. Es ist bekannt, daß  $K^+$  und  $Ca^{++}$  z. B. bei höherer Dosierung herztoxisch wirken.

Ähnliche Beziehungen findet man bei den oralen  $LD_{50}$ -Werten. Die höchste Toxizität zeigt die freie Ameisensäure (1,1 g/kg). Ihre Giffigkeit ist in erster Linie durch die freien H-Ionen bedingt, weniger durch die Formiationen. Dies erhellt aus dem Vergleich mit Natriumformiat. Hier liegt die  $LD_{50}$  bei 11,2 g/kg, bzw. auf Formiat bezogen, bei 7,41 g/kg. Vergleichsweise beträgt die  $LD_{50}$  für Kochsalz 3,096 g/kg bei intraperitonealer Applikation.

### 2. Chronische Toxizität

Seit mehr als 3 Jahren laufen chronische Fütterungsversuche an Wistar-Ratten mit Calciumformiat (0,2% im Trinkwasser). In Versuch genommen wurden zu Anfang 8 männliche und 24 weibliche Tiere mit einem Körpergewicht von 160–210 g, dazu 8 Kontrollen.

Nach unseren Messungen nehmen die Tiere 150–200 mg Calciumformiat pro Kilogramm täglich zu sich. Wir stehen gegenwärtig in der 5. Generation, ohne daß sich hier Auffälligkeiten hinsichtlich Wachstum und Fertilität ge-

zeigt hätten. Auch die Organfunktionen waren nicht gestört. Insbesondere wurden keine Augenhintergrundstörungen beobachtet, weder *in vivo* noch bei der späteren neuropathologischen Untersuchung. In Tab. 2 ist der Wachstumsverlauf in den ersten Versuchswochen wiedergegeben; in Tab. 3 die Fertilität der Muttertiere aus der I. Calciumformiatgeneration; in Tab. 4 der Wachstumsverlauf der I. bis III. Generation.

Tab. 2. Gewichtskurven bei 4 Versuchs- und 2 Kontrollgruppen mit je 4 Wistar-Ratten (160–210 g). Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen

Wochen	0,2% Ca(HCOO) <sub>2</sub> im Trinkwasser				Kontrollen	
	I ♀	II ♀	III ♀	IV ♂	V ♀	VI ♂
1	175 ± 8,9	170 ± 12,5	170 ± 11,0	195 ± 9,4	170 ± 11,2	200 ± 9,8
2	205	190	185	230	195	235
3	220	190	195	250	210	260
4	230	200	200	270	225	275
5	240	205	210	285	235	288
6	240	215	220	300	238	290
7	240	220	225	310	240	305
8	255	220	230	320	260	318
10	262	228	235	340	268	340
12	275 ± 10,6	240 ± 9,8	238 ± 9,5	353 ± 13,4	270 ± 9,0	360 ± 14,2
15	283 ± 9,5	245 ± 10,5	240 ± 13,0	355 ± 11,8	290 ± 10,6	370 ± 12,7

Seit 2 Jahren läuft bei gleichem Versuchsansatz eine weitere Versuchsserie mit der doppelten Calciumformiat-Dosis (0,4% im Trinkwasser). Unsere Versuchstiere stehen in der 2. Generation. Auch hier sind keine Störungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen aufgetreten, wie die pathologisch-histologischen Untersuchungen – durchgeführt von Herrn Prof. LINDNER (Pathologisches Institut der Universität Hamburg) – ergeben haben.

Tab. 3. Fertilität von Ratten, die täglich – ebenso wie ihre Elterntiere – 200 mg/kg Calciumformiat erhalten hatten. Körpergewicht und Länge der Feten mit Angabe der Standardabweichung

Nr.	Muttertiere,		Würfe,		Bemerkungen	
	I. Ca-Formiat-Generation	II. Ca-Formiat-Generation	Gewicht in g	Alter in Monaten		
Gewicht in g Alter in Monaten Zahl						
a) 0,2% Calciumformiat im Trinkwasser:						
1	240	7	11	4,2 ± 0,24	3,7 ± 0,18	
2	210	6	6	5,7 ± 0,56	4,1 ± 0,21	
3	220	7	8	4,8 ± 0,23	3,9 ± 0,16	
4	240	7	12	4,9 ± 0,47	4,1 ± 0,26	
5	280	10	7	6,9 ± 0,51	4,7 ± 0,26	
b) Unbehandelte Kontrollratten:						
1	270	8	10	4,5 ± 0,39	3,9 ± 0,18	
2	240	8	8	5,1 ± 0,43	4,2 ± 0,24	

Tab. 4. Chronische Fütterungsversuche an Wistar-Ratten. Tägliche Gabe von rd. 200 mg/kg Calciumformiat im Trinkwasser. Angabe der mittleren Körpergewichte mit Standardabweichung

	I. Generation n = 11	II. Generation n = 9	III. Gen. n = 10	Kontrolle n = 10	
Geburts- gewicht	5,0 ± 0,46	5,8 ± 0,61	5,5 ± 0,33	4,9 ± 0,55	5,6 ± 0,58
1. Woche	16,0	19,5	18,2	15,9	14,8
2. Woche	34,0	32,5	31,7	28,0	29,1
3. Woche	49,0	55,0	48,0	48,0	52,0
4. Woche	79,0	84,0	78,0	85,0	76,0
	± 3,8	± 3,7	± 4,0	± 3,2	± 3,6 <sup>1)</sup>
5. Woche	108	118	112	109	113
6. Woche	128	138	136	134	145
7. Woche	160	159	155	153	165
8. Woche	179	174	177	180	182
	± 3,9	± 4,8	± 6,0	± 4,3	± 5,1
10. Woche	216	220	217	224	221
14. Woche	291	297	301	295	293
18. Woche	297	309	—	—	—
20. Woche	309	318	310	313	320
	± 5,0	± 6,2	± 6,8	± 5,2	± 5,8

Vor 1½ Jahren setzten wir eine neue Versuchsserie mit noch höherer Formiatdosis bei gleicher Ausgangstierzahl an (Trinkwasser mit einem Gehalt von 1% Natriumformiat). Vor kurzem untersuchten wir bei 6 Ratten die tägliche Ameisensäureaufnahme und -ausscheidung (s. Tab. 5). Man erkennt, daß pro Tier 185,4 mg Ameisensäure aufgenommen und 26,2 mg Ameisensäure ausgeschieden werden. Somit werden 13,8% der insgesamt aufgenommenen Ameisensäure durch den Urin eliminiert.

Tab. 5. Tägliche Ameisensäureaufnahme und -ausscheidung im chronischen Versuch an Ratten (n = 6). Mittleres Körpergewicht 375 g. Zufuhr im Trinkwasser als 1% Natriumformiatlösung. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen

a) Aufgenommenes Natriumformiat

Trinkmenge in ml	Na-Formiat mg	Berechnet als AS mg
27,4 ± 4,45	274,0 ± 44,5	185,4 ± 30,3

b) Ameisensäure-Ausscheidung

Urinmenge ml	AS mg %	AS insges. mg	AS in % der Aufnahme
12,1 ± 3,46	223,9 ± 43,6	26,2 ± 9,6	13,8 ± 3,1

<sup>1)</sup> Versuch wurde nicht weiter verfolgt.

Vergleichsweise wurden in anderen Versuchen bei etwa 10fach niedrigerer Natriumformiatzufuhr nur 3% des zugeführten Formiats, im 24-Stunden-Urin ausgeschieden.

Bei chronischen Toxizitätsstudien am Hund – vier Hunde erhielten 5 g Natriumformiat im Fleischhack täglich – läßt sich zeigen, daß offenbar beim Fleischfresser die Oxydation der Ameisensäure viel langsamer verläuft als bei der Ratte. Es werden innerhalb von 24 Stunden etwa 38–40% des zugeführten Formiats im Urin ausgeschieden. Bei einem Hund konnte der Versuch 12 Tage durchgeführt werden (mit 2 Leertagen); die anderen Hunde verweigerten nach 3–4 Tagen die Annahme der Fleischhappen.

Die pathologisch-anatomischen Untersuchungen nahm Herr Prof. LINDNER vom Pathologischen Institut der Universität Hamburg vor. Sie erstreckten sich auf mehr als 250 Wistar-Ratten. Es handelte sich um Alttiere und um erwachsene männliche und weibliche Ratten aus 3 Nachwuchsgenerationen, die über einen Zeitraum von 2 Jahren eine tägliche Dosis von 200 mg/kg Calciumformiat im Trinkwasser erhalten hatten.

Die makroskopische und histologische Untersuchung aller mit Calciumformiat behandelten Ratten ergab keine verdachterregenden Befunde, nur stellenweise geringe Phagozytosevorgänge in mäßig proliferierten retikulo-endothelialen und retikulo-histiozytären Elementen speziell von Lunge und Milz, teilweise auch im lymphatischen Gewebe, soweit es mitgeschnitten wurde, also Bauchlymphknoten etc., jedoch nicht in der Leber. An der Leber selbst waren keinerlei Besonderheiten festzustellen. Abgesehen von 2 gutartigen Spontantumoren bei Alttieren waren weder im Digestionstrakt, einschließlich Leber und Niere, noch in den anderen Geweben bösartige Geschwülste festzustellen. Somit sind Zeichen einer chronischen Intoxikation an keinem der untersuchten Organe festzustellen, sondern lediglich Befunde, die in den Bereich der Norm gehören.

Es wurden ferner Fertilität und Schwangerschaftsverlauf, sowie Entwicklung der Embryonen, Wurfzahl und Heranwachsen der neuen Generation beobachtet. Es zeigte sich, daß Muttertiere der 1., 2. und 3. Calciumformiat-Generation, die von ihrem Lebensbeginn an Calciumformiat erhalten hatten, eine normale Zahl wohl ausgebildeter Feten zur Welt gebracht hatten. Die Feten unterschieden sich weder im Körpergewicht noch in der Körperlänge von den Feten der Kontrollen. Ein Teil der Feten (76) wurde gleich nach der Geburt getötet und seziert.

Pathologisch-anatomisch waren Verbildungen an den Embryonen oder an der Placenta nicht feststellbar, abgestorbene Implantate, sogen. Deciduomata, waren nicht auffindbar, mutationsauslösende oder teratogene Wirkungen nicht nachweisbar, Organanlagen und -entwicklungen regelrecht.

### 3. Toxizitäts- und Teratogenitätsprüfungen am Hühnerembryo

Natriumformiat führt bei Injektion in die Luftblase des bebrüteten Hühner-ees (48 bzw. 96 h nach Bebrütungsbeginn) in Dosen von 5 mg, 10 mg oder 20 mg/Ei zu keinem vermehrten Absterben der Embryonen. Die Überlebensrate liegt auf der gleichen Höhe wie die der Kontrollen. Die Embryonen-Endgewichte der mit Natriumformiat behandelten Eier lassen keine Abweichungen erkennen. Natriumformiat, das nach 10–12 Tagen Bebrütungs-

dauer vollständig eliminiert wird, und zwar vorzugsweise durch Oxydation, erweist sich am bebrüteten Hühnerei als teratogen unauffällig. Gegenüber den unbehandelten Kontrollen ( $n = 1051$ ) wird keine Änderung der Mißbildungshäufigkeit weder in quantitativer noch qualitativer Hinsicht beobachtet. Am gleichen Versuchsmodell lässt sich hingegen mit Hydrocortison (0,025 mg/Ei) eine hochsignifikante Zunahme der Mißbildungsraten beweisen.

Der Abbau der Ameisensäure, die am 4. Brütungstag in Form ihres Natriumsalzes appliziert worden war und während der 1. Embryonalperiode kontinuierlich auf den Embryo einwirken konnte, ist aus der beigefügten Abbildung deutlich zu erkennen.

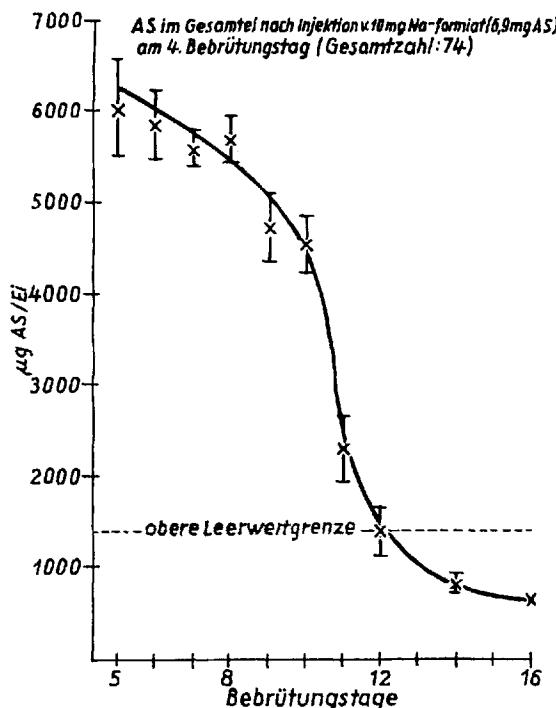


Abb. 1. Ameisensäuregehalt des Gesamtei während der Embryonalentwicklung. Injektion von 10 mg Na-formiat (6,9 mg AS) am 4. Bebrütungstag ( $n = 74$ ). [Entnommen aus LANGE, G.: Inaug. Diss. Hamburg 1968]

#### 4. Biochemisch-pharmakologische Wirkungen

Nach Infusion einer 0,2 M Ameisensäure-Ringer-Lösung (0,918% AS) in einer Gesamtdosis von 1,17 mM/kg bildet sich beim Hund eine starke metabolische Acidose aus, die nach 4 h reversibel ist (s. Tab. 6). Es entsteht kein Methaemoglobin. Die Ameisensäure-Konzentration erreicht im Blut einen Wert von 18,25 mg% und fällt stetig, einer Exponentialfunktion folgend, in 4 h zum Ausgangswert ab. Ähnliche Ergebnisse – mit Ausnahme des starken pH-Abfalls im Blut – erhält man bei Infusion einer 0,2 M Natriumformiat-

Tab. 6. Infusion äquimolarer Lösungen von Natriumformiat und Ameisensäure beim Hund. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen  
 [Entnommen aus MARLORNY, G., N. RIETBROCK und M. SCHNEIDER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 250, 419 (1965)].  
 D<sub>0</sub> = Leerwert, D<sub>50</sub> = 50% der Infusionsmenge, D<sub>100</sub> = 100% der Infusionsmenge

n	kg	D <sub>0</sub>	Infusion						Zeit nach Infusion				
			D <sub>50</sub>	D <sub>100</sub>	2	9	20	40	60	120	180	240	
a) Infusion einer 0,2 M Natriumformiat-Ringerlösung (pH 6,89), 8 ml/min													
6	12,1 ± 2,9	pH ± 0,03	7,44 ± 0,03	7,41 ± 0,03	7,40	7,40	7,39	7,39	7,39	7,41	7,41	7,42	
		AS mg %	0,70 ± 0,31	11,90 ± 3,48	18,25 ± 4,09	14,51 ± 2,08	12,23 ± 2,00	10,51 ± 2,14	8,33 ± 1,82	7,60 ± 1,74	4,17 ± 2,02	2,35 ± 2,06	0,98 ± 0,89
b) Infusion einer 0,2 M Ameisensäure-Ringerlösung (pH 2,35), 8 ml/min													
6	13,0 ± 4,4	pH ± 0,03	7,45 ± 0,07	7,33 ± 0,06	7,30 ± 0,06	7,31 ± 0,06	7,33 ± 0,04	7,35 ± 0,05	7,37 ± 0,05	7,38 ± 0,05	7,38 ± 0,03	7,41 ± 0,05	7,42 ± 0,03
		AS mg %	1,15 ± 1,18	12,58 ± 4,53	20,28 ± 3,57	15,30 ± 1,84	11,85 ± 1,52	10,65 ± 3,18	8,65 ± 1,17	7,61 ± 1,59	4,57 ± 2,06	2,31 ± 1,70	0,90 ± 0,70

lösung (1,36%). Die biologische Halbwertszeit (HWZ) für Ameisensäure beim Hund beträgt 77 min. Das Maximum der Formiatoxydation – meßbar an der  $\text{CO}_2$ -Ausscheidung – findet man 1 h nach Absetzen der Infusion.

Die Katze zeigt eine HWZ von 67 min bei Infusion der gleichen Formiatmenge pro Kilogramm Körpergewicht. Erheblich niedriger liegt die HWZ bei den Nagern (Kaninchen 32 min, Meerschweinchen 22 min und Ratte 12 min). Die raschere Formiatoxydation bei Pflanzenfressern mag mit dem höheren Angebot an Ameisensäure und vor allem an Folsäure zusammenhängen. Nach unseren Untersuchungen an der Katze führt Zulage von Folsäure zu einer Beschleunigung der Ameisensäure-Oxydation. Dementsprechend hemmen Folsäure-Antagonisten, z. B. Methotrexat, die Ameisensäure-Oxydation.

Im Stoffwechsel der Ameisensäure kommt der Leber eine besondere Bedeutung zu. Belastet man Kaninchen, bei denen die Leber in möglichst schonender Weise ausgeschaltet wurde, mit einer 0,2 M Natriumformiat-Ringer-Lösung (1,17 mM/kg), so wird die Ameisensäure-Halbwertszeit, die in den Kontrollversuchen nur 35 min beträgt, auf 130 min verlängert. Die Oxydation der Ameisensäure ist also gehemmt, die Elimination verzögert. Auch bei Versuchen *in vitro* läßt sich die zentrale Stellung der Leber erkennen. Die von Blutresten freigespülte und homogenisierte Rattenleber setzt bei Inkubierung des Homogenats im Brutschrank erhebliche Formiatmengen um. Nach 2 h findet man nur noch 57% des zugesetzten Formiats wieder.

### Zusammenfassung

Gemäß unserer Untersuchungsergebnisse sind Ameisensäure und ihre Salze meines Erachtens bis zu bestimmten Grenzmengen, wie sie beispielsweise in der Liste 2 des geänderten und ergänzten Lebensmittelgesetzes vom 21. 12. 1958 angegeben sind (Tageshöchstmenge 1 g, Höchstkonzentration 1 g/kg), als nicht gesundheitsschädlich anzusehen. Als Gründe seien angeführt:

Ameisensäure ist ein normaler Bestandteil des menschlichen Blutes und der Gewebe; sie spielt im intermediären Stoffwechsel eine hochwichtige Rolle bei der Übertragung von  $\text{C}_1$ -Körpern.

Ameisensäure kommt in bestimmten Lebensmitteln, wenn auch nur in geringen Mengen, vor, wie z. B. in der Seefischmuskulatur, im Honig, in Röstprodukten und in einigen Früchten.

Zugeführte Ameisensäure wird vollständig abgebaut und ausgeschieden; es besteht keine Cumulationsgefahr.

Die chronische Zufuhr von 200 mg/kg Calciumformiat bei der Ratte im Zweijahres-Versuch führt keine stoffspezifischen Schädigungen der Organfunktionen herbei und hemmt nicht Wachstum und Entwicklung neuer Generationen.

Am bebrüteten Hühnerei wirkt Ameisensäure in Form ihres Natriumsalzes (5 mg, 10 mg und 20 mg/Ei) nicht toxisch und nicht teratogen auf den bebrüteten Hühnerembryo.

### Literatur

1. World Health Organization. Technical Report Ser. No. 309 (Geneva 1965).

### Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. med. G. MALORNY  
 Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg,  
 2000 Hamburg 20, Martinistr. 52