

Ueber den Nachweis der Bernsteinsäure.

Von
Carl Neuberg.

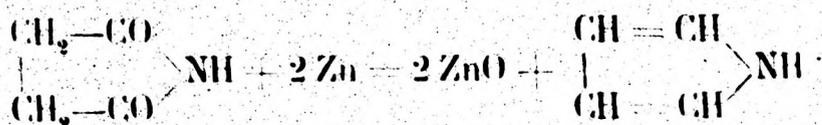
(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 16. December 1900.)

Der übliche Nachweis von Bernsteinsäure beruht auf der Reindarstellung der Säure und deren Identificirung durch Schmelzpunkt oder Verwandlung in das charakteristische Bleisalz.

Diese Methode hat das Vorhandensein grösserer, greifbarer Mengen der Substanz zur Voraussetzung und versagt demnach bei geringen Quantitäten.

Die Erkennung solcher lässt sich nun in sehr einfacher Weise auf die so überaus empfindliche Pyrrolreaction¹⁾ gründen.

Im Jahre 1880 zeigte C. A. Bell,²⁾ dass Bernsteinsäuremit durch Glühen mit Zinkstaub nach der Gleichung:



in Pyrrol übergeht.

Wie zu erwarten war, ergaben Versuche, dass sich Ammoniumsuccinat und demgemäss Lösungen von Bernsteinsäure in überschüssigem Ammoniak genau wie Succinimid verhalten, d. h. beim Erhitzen mit Zinkstaub Pyrrol liefern: dieses gibt sich in minimalster Menge durch eine allmählich

¹⁾ Runge, Poggendorff's Annalen 31, 67.

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 13, 877.

sich vertiefende Rothfärbung zu erkennen, die es einem mit Salzsäure benetzten Fichtenspähne ertheilt.

Die Empfindlichkeit dieser Reaction ist ziemlich beträchtlich, da 1 ccm. einer $\frac{1}{100}$ -Normalbernsteinsäure — 0,0006 g reiner Bernsteinsäure noch die Färbung mehrerer Fichtenspähne gestattet.

Die Anstellung der Probe ist überaus einfach. Man engt die auf Bernsteinsäure zu untersuchende Flüssigkeit nach Zusatz von einigen Cubikcentimetern Ammoniaklösung im Reagensglase auf etwa 1 ccm. ein, fügt dann etwa 1 g käuflichen Zinkstaub hinzu, der die Flüssigkeit aufsaugt und eine gleichmässige Vertheilung derselben bewirkt, und glüht. Die entweichenden Dämpfe färben dann bei Anwesenheit von Bernsteinsäure, entsprechend deren Menge, Fichtenspähne (Streichhölzer) hell- oder dunkelroth, wenn diese, mit starker Salzsäure befeuchtet, in die Reagensglasöffnung gehängt werden. Dabei ist die Vorsicht zu gebrauchen, die Fichtenspähne erst nach Vertreibung des überschüssigen Ammoniaks in die Dämpfe einzuführen, um eine Neutralisation der Salzsäure zu vermeiden.

Befindet sich die Bernsteinsäure in der zu untersuchenden Flüssigkeit nicht als freie Säure, sondern an Metall gebunden, so lässt sie sich in vielen Fällen (Erdalkali- und Schwermetallsalz) genau ebenso nachweisen, wenn man statt des Ammoniaks Ammoniumcarbonat anwendet. Ganz sicher gelingt ihre Auffindung, wenn man die Umwandlung in das Ammonsalz durch Ammoniumphosphat bewirkt, indem man zu der mit Ammoniak auf ein kleines Volumen eingedampften Flüssigkeit vor Zugabe des Zinkstaubs einige Krystalle von phosphorsaurem Ammonium fügt.

Ebenso lässt sich der Nachweis von Bernsteinsäure in Niederschlägen (Silbersalz) führen, indem man unbekümmert um etwaige feste Ausscheidungen genau nach der gegebenen Vorschrift verfährt.

Die mitgetheilte Prüfung auf Bernsteinsäure ist ausserordentlich empfindlich und durchaus charakteristisch, solange keine Substanzen zugegen sind, die gleichfalls die Fichtenspahnreaction geben.

Diese erhält man nun unter ähnlichen Bedingungen mit einer Reihe von Körpern, die sich in folgende Gruppen einordnen:

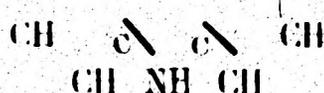
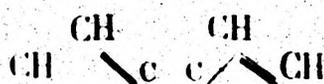
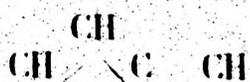
I. Pyrrolgruppe.



Ausser Pyrrol und seinen Derivaten entwickeln



Verbindungen mit condensirtem Pyrrolkern, wie Indol



samt ihren Homologen direkt beim Erhitzen Dämpfe, die einen mit Salzsäure getränkten Fichtenspahn röthen. Hierhin gehören auch die Eiweisskörper, die ja eine Indolgruppe enthalten und als deren Spaltungsprodukt auch Pyrrol auftritt.

II. Die γ -Diketone $\text{R}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{R}$ sowie

Furan $\begin{array}{c} \text{CH}=\text{CH} \\ | \quad | \\ \text{CH}=\text{CH} \\ | \quad | \\ \text{O} \end{array}$ und seine Derivate gehen beim Erwärmen

mit Ammoniak, resp. mit Chlorzinkammoniak oder Chlorkaliumammoniak leicht in Pyrrolabkömmlinge über und gaben dann die Fichtenspahnreaction.

III. Eine Reihe von Säuren geben beim Erhitzen ihrer Ammoniumsalze oder als Amidosäuren direkt Pyrrol, so die

Schleimsäure und die isomere Zuckersäure $\begin{array}{c} \text{CH} \cdot \text{OH} - \text{CH} \cdot \text{OH} - \text{COOH} \\ | \quad | \quad | \\ \text{CH} \cdot \text{OH} - \text{CH} \cdot \text{OH} - \text{COOH} \end{array}$

sowie die Glutaminsäure $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{array}{l} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \\ | \\ \text{CH}_2 - \text{COOH} \end{array}$

IV. Ammoniumsalze, Amide und Imide einiger mehrbasischer Säuren, die wie die Körper der Gruppe II

und III die Atomanordnung $\begin{array}{c} \text{C}-\text{C} \\ | \quad | \\ \text{C}-\text{C} \end{array}$ besitzen, liefern beim Erhitzen

und gleichzeitiger Reduction mittels Zinkstaubs lichtenpahn-röthende Dämpfe, so die Bernsteinsäure, Aepfelsäure, Weinsäure, Asparaginsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Citronensäure, Aconitsäure, Tricarballoylsäure etc.

V. Schliesslich entsteht Pyrrol auch aus Hämin beim Erhitzen mit Zinkstaub.

Aus der Zahl der Substanzen, welche die Pyrrolreaction geben, kommen für die thier-physiologische Untersuchung ausser Bernsteinsäure nur Albumin, Hämin und Indolderivate in Betracht. Aber auch bei Gegenwart dieser Körper lässt sich mittels der Fichtenspahnreaction die Bernsteinsäure eindeutig und scharf erkennen, da sie sich leicht von ihnen trennen lässt.

Die Scheidung der Bernsteinsäure von Albumin und Hämin erfolgt am einfachsten durch Aether, indem man das zu untersuchende Object 3 bis 4 mal in schwach schwefelsaurer Lösung mit Aether extrahirt. Dieser nimmt zuweilen, wenn er alkoholhaltig ist, ausser der Bernsteinsäure aus der sauren Lösung etwas Hämin auf. Dasselbe wird aber durch Eindampfen der vereinigten Aetherauszüge unlöslich; der Rückstand gibt an reinen trockenen Aether nur Bernsteinsäure ab, die nach Abdunsten des Lösungsmittels in minimalster Menge durch die beschriebene Reaction erkannt wird.

Die Trennung von Bernsteinsäure und Indolbasen,¹⁾ die gleichfalls in den Aether übergehen, kann in alkalischer Lösung durch Wasserdampf erfolgen, der in kurzer Zeit Indol und Homologe mit fortführt.²⁾

Die Erkennung von Bernsteinsäure neben Albumin, Hämin und Indolderivaten bietet um so weniger Schwierigkeiten, als man auf die beiden letzten Substanzen durch Herkunft, Farbe und Geruch des Untersuchungsobjects meist vorbereitet ist.

Der Gang der Prüfung ist folgender:

Um die eventuell an Basen gebundene Bernsteinsäure

1) Indol und Skatol sind sehr schwache Basen von vollkommenem Kohlenwasserstoffcharakter. Sie bilden wie ihre Muttersubstanz, das Pyrrol, nur mit Pikrinsäure ein Salz und gehen daher aus mineralsaurer Lösung in Aether über.

2) Skatolcarbonsäure und Skatolelessigsäure sind nicht mit Wasserdampf flüchtig; sie können aber in Form ihrer unlöslichen Nitrosoderivate aus der Lösung entfernt werden. (E. Salkowski, Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 24 u. XXVII, S. 303. M. Nencki, Wiener Monatshefte 10, 516.)

frei zu machen, säuert man das Untersuchungsobject zunächst mit verdünnter Schwefelsäure an und schüttelt dann 3 bis 4 mal mit Aether aus. Der Abdampfrückstand der vereinigten Aetherauszüge enthält dann die Bernsteinsäure eventuell neben Indolderivaten und Spuren von Hämin.

Die Anwesenheit der beiden letzten Substanzen erkennt man am schnellsten daran, dass eine Probe direkt beim Erhitzen (Indolabkömmlinge) oder nach Zusatz von Zinkstaub (Hämin) die Fichtenspähureaction gibt.

Ergibt sich hierbei die Abwesenheit von Hämin und Indolderivaten, so prüft man direkt mit Ammoniak und Zinkstaub auf Bernsteinsäure; anderenfalls müssen jene störenden Substanzen zuvor entfernt werden.

Zur Trennung von Hämin nimmt man den trockenen Aetherrückstand noch einmal mit wasserfreiem Aether auf, filtrirt und verdunstet. Der Rückstand ist jetzt frei von Hämin.

Zur Entfernung von Indolderivaten versetzt man die Flüssigkeit mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaction und leitet kurze Zeit einen Dampfstrom hindurch. Wenn nach einigen Minuten eine Probe der Flüssigkeit oder bei Verwendung eines Kühlers das Destillat keine fichtenspahn-röthenden Dämpfe mehr beim Erhitzen entwickelt, so sind Indol und Homologe fortgeführt, und man prüft nun die Flüssigkeit nach Neutralisation mittels Schwefelsäure und Zusatz von Ammoniak, Ammoniumphosphat und Zinkstaub auf Bernsteinsäure.

Die beschriebene Methode zum Nachweis der Bernsteinsäure ist in gleicher Weise mit festem und flüssigem Material ausführbar. Ihr Vorzug vor dem alten, auf Reindarstellung der Säure beruhenden Verfahren liegt besonders darin, dass sie mit ausserordentlich viel geringeren Substanzmengen ausführbar ist.