

Über das Vorkommen von Bernsteinsäure im Fleischextrakt und im frischen Fleische.

Von

Hans Einbeck.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 25. Juli 1913.)

Unter den sauren Extraktivstoffen der Muskeln kommt neben der Milchsäure, die schon frühzeitig gefunden wurde,¹⁾ der Bernsteinsäure eine besondere Rolle zu.

Der erste, der Bernsteinsäure, allerdings nicht aus Muskelgewebe, sondern aus Drüsensäften (Rindermilz, Thymus und Thyreoidea von Kälbern) isolierte, war v. Gorup-Besanez.²⁾ Als Bestandteil des Fleischextraktes findet sie Weidel bei der Aufarbeitung unlöslicher Rückstände von Bleizuckerfällungen, die zur Darstellung von Carnin dienen sollten.³⁾ Besondere Bedeutung wurde dem Vorkommen der Bernsteinsäure in tierischen Sekreten und Muskelextrakten zuteil, nachdem E. und H. Salkowski nachgewiesen hatten, daß die Säure als ein ständiges Produkt der Eiweißfäulnis auftritt.⁴⁾ Die Bernsteinsäure galt nach diesem Befunde als bactericides postmortales Produkt, zumal «die gleichzeitig angestellte Untersuchung von frischem Fleisch nur zweifelhafte Spuren der Säure lieferte». Da E. Salkowski der Frage nach dem eventuellen Vorkommen von Bernsteinsäure in frischem tierischen Gewebe schon damals große Wichtigkeit zuerkannte, ließ er dieselbe durch Blumenthal erneut und eingehend prüfen. Aber auch bei dieser Untersuchung konnte in frischem Gewebe keine Bernsteinsäure

¹⁾ Liebig, Liebigs Annalen, Bd. 62, S. 326 (1847).

²⁾ Liebigs Ann., Bd. 98, S. 28 (1856).

³⁾ Liebigs Annal., Bd. 158, S. 366 (1871).

⁴⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 12, S. 650 (1879).

gefunden werden.¹⁾ Zu demselben Resultate kommt Macleod.²⁾ Auch H. Wolff konnte aus Fleisch nur dann Bernsteinsäure isolieren, nachdem es partiell in Fäulnis übergegangen war.³⁾ Als eine etwas abweichende Entstehungsweise der Bernsteinsäure aus tierischem Gewebe (hauptsächlich Leber) wurde von Magnus-Levy die aseptische und antiseptische Autolyse aufgefunden.⁴⁾

Während die Befunde aller vorerwähnten Forscher die Bernsteinsäure als ein Zertrümmerungsprodukt des tierischen Eiweißes ganz allgemein erscheinen ließen, glaubte inzwischen Siegfried den Bestandteil des tierischen Gewebes, welcher auch ohne Bakterienwirkung Bernsteinsäure liefert, gefunden zu haben.⁵⁾ Es war ihm gelungen, aus Fleischextraktlösungen, aus denen durch Behandlung mit Baryum- oder Calciumsalzen der anorganische Phosphor entfernt war, durch Fällung mittels Eisenchlorid ein Produkt zu erhalten, welches bei der Hydrolyse Bernsteinsäure lieferte. Es war dieses die heißumstrittene Phosphorfleischsäure und deren Eisenverbindung, das Carniferrin, nach Siegfried ein Extraktivstoff der Muskeln, der die Bernsteinsäure als integrierenden Bestandteil in sozusagen komplexer Bindung oder vielmehr so vorgebildet enthält, daß sie bei der Hydrolyse als Spaltstück entsteht. Den Beweis für die Einheitlichkeit des Carniferrins sah Siegfried, wenn er auch von der chemischen Identität der einzelnen Nucleone verschiedener Herkunft (Fleisch vom Kalb, Pferd, Rind usw., Milch) absehen wollte,⁶⁾ im verhältnismäßig guten Übereinstimmen der Analysenzahlen für Stickstoff, Phosphor und Eisen bei Carniferrinen verschiedener Herkunft.⁷⁾

Die Ansicht von Siegfried, durch Eisenchloridfällung von Fleischextraktlösungen zu einer chemisch einheitlichen

¹⁾ Virchows Archiv, Bd. 137, S. 539 (1894).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 28, S. 557 (1899).

³⁾ Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 4, S. 254 (1903).

⁴⁾ Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 2, S. 274 (1902).

⁵⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1894, S. 401. — Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 360, 380 (1895/6); Bd. 28, S. 524 (1899).

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 28, S. 526 (1899).

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 372 (1895/6).

Substanz zu gelangen, wurde sehr bald angegriffen. Sowohl Folin¹⁾ wie Kutscher²⁾ beschäftigten sich mit dieser Frage. Für sie kam aber zunächst mehr der Pepton- resp. Albumosecharakter tragende Anteil des Carniferrins in Betracht.

Erst als Kutscher und Steudel³⁾ auf der Suche nach Methoden, die Güte des käuflichen Liebig'schen Fleischextraktes zu prüfen, bei der Verarbeitung desselben erhebliche Mengen (bis zu 1 g auf 50 g Fleischextrakt) von Bernsteinsäure fanden, wurde die Frage nach der Herkunft der Bernsteinsäure akut. Kutscher und Steudel traten derselben zunächst nicht näher, sie lehnten aber einerseits die Phosphorfleischsäure als Quelle der Bernsteinsäure ab, andererseits glaubten sie auch bactericide oder autolytische Prozesse für die Entstehung der Säure nicht in Betracht ziehen zu sollen.

Siegfried⁴⁾ suchte das von ihm aufgefundene Carniferrin gegen die Angriffe von Kutscher und Steudel zu verteidigen, indem er nachwies, daß die Isolierungsmethoden der Bernsteinsäure jener zu einer Spaltung der Phosphorfleischsäure führen mußten. Er kommt auf Grund seiner Versuche zu dem Schlusse, daß er zwar die Frage, ob es Fleischextrakte mit präformierter Bernsteinsäure gäbe, offen lasse, daß aber der Gegenbeweis dafür, daß die Bernsteinsäure als Zersetzungsprodukt von Extraktivstoffen der Muskeln anzusehen ist, und daß Phosphorfleischsäure dieser Extraktivstoff ist, nicht erbracht sei.

Den Versuch, die Frage nach präformierter Bernsteinsäure im Fleischextrakt unter Ausschaltung der Möglichkeit einer Zersetzung der Phosphorfleischsäure zu entscheiden, machte H. Wolff.⁵⁾ Er ging von der Überlegung aus, daß bei der Fällung der Phosphorfleischsäure durch Eisenchlorid zwar ein Teil der etwa vorhandenen präformierten Bernsteinsäure mitgefällt würde, daß aber höchstwahrscheinlich ein

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 25, S. 163 (1898).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 26, S. 119 (1898/9).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 101 (1903).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 126 (1903).

⁵⁾ E. Salkowski, Festschrift, 1904, S. 443.

Teil derselben der Fällung entgehen würde. Er verarbeitete infolgedessen die Mutterlaugen des Carniferrins auf Bernsteinsäure, und es gelang ihm, überall da, wo die gefällte Phosphorfleischsäure nach der Hydrolyse Bernsteinsäure lieferte, dieselbe im Filtrat des Carniferrins gleichfalls nachzuweisen.

Dieser Befund wäre beweisend, wenn nicht der Einwand gemacht werden könnte, daß diese Bernsteinsäure etwa aus Phosphorfleischsäure stammt, die der Carniferrinfällung entgangen und dann bei der Weiterverarbeitung gespalten worden ist.

Anschließend an die Versuche von Wolff wandte auch ich meine Aufmerksamkeit den Mutterlaugen des Carniferrins zu. Es zeigte sich, daß dieselben durch weitere Zufügung von Eisenchlorid und nachfolgende Neutralisierung mit Ammoniak erneute und zwar sehr erhebliche Niederschlagsmengen liefern. Die Niederschläge wurden von mir bisher nur auf Bernsteinsäure und Phosphorgehalt untersucht. Es ergab sich, daß dieselben stets Bernsteinsäure enthielten und zwar prozentual ähnliche Quantitäten, wie die Carniferrinfällungen. Um zu sehen, ob diese II. Fällungen die Bernsteinsäure der Lösung quantitativ entzogen hatten, wurden die Mutterlaugen derselben eingedampft und nach Zugabe von Schwefelsäure mit Äther-Alkohol erschöpft. Es zeigte sich, daß teilweise auch diese Mutterlaugen noch Bernsteinsäure enthielten. Die Summe der aus den II. Fällungen und deren Mutterlaugen gewonnenen Bernsteinsäure betrug das 3—6fache der aus Carniferrin isolierten Säure.

Um nun festzustellen, ob diese Bernsteinsäure aus Phosphorfleischsäure stammen kann, die der ersten Fällung durch Eisenchlorid entgangen war, wurde der Phosphorgehalt der II. Fällungen bestimmt. Derselbe ist minimal und dürfte in keinem Falle 0,12% überschreiten. Auch in den Endmutterlaugen ist wenig Phosphor enthalten. In dem einen untersuchten Falle (Vers. LFE 34) lauten die Zahlen des Phosphorgehalts für Carniferrin, II. Fällung und Mutterlauge 0,232 g, 0,038 g und 0,048 g. Dieser Befund schließt die Möglichkeit aus, daß die relativ großen Bernsteinsäuremengen, welche aus den II. Fällungen und deren Mutterlaugen isoliert werden konnten,

von Phosphorfleischsäure herrühren, welche der ersten Eisenchloridfällung entgangen war.

Der geringe Phosphorgehalt der Carniferrinmutterlaugen kann aber meines Erachtens auch als Gegenbeweis dafür herangezogen werden, daß die gesamte Bernsteinsäure aus Phosphorfleischsäure stammt. Man müßte sonst die höchst unwahrscheinliche Annahme machen, daß selbst im frisch bereiteten Fleischextrakt nur $\frac{1}{4}$ der vorhandenen Phosphorfleischsäure als solche intakt ist. (Vers. Fr. F. 2a.)

Durch diese Versuche glaube ich den Beweis erbracht zu haben, daß die Siegfriedsche Phosphorfleischsäure nicht als der komplexe Extraktivstoff der Muskeln in Betracht kommt, auf dessen Zerfall das Vorkommen der Bernsteinsäure im Fleischextrakt zurückgeführt werden muß.

Ob überhaupt die Annahme eines solchen Stoffes begründet ist oder nicht, lasse ich dahingestellt sein, umsomehr, da ich glaube, die zunächst wichtigere Frage, ob die Bernsteinsäure, welche jetzt wohl allgemein als regelmäßiger Bestandteil des Fleischextraktes betrachtet wird,¹⁾ wirklich ein postmortales, eventuell bactericides Produkt ist, in negativem Sinne entschieden zu haben. Es standen sich in dieser Frage bisher zwei Beobachtungen gegenüber: einmal die bereits erwähnten Arbeiten von Salkowski, Blumenthal, Magnus-Levy und Wolff,²⁾ auf Grund deren sich die allgemeine Überzeugung gebildet hat, daß frisches Fleisch keine Bernsteinsäure liefert, und dann die Beobachtung von Siegfried, daß aus jedem frischen Gewebeextrakt Carniferrin erhalten werden kann, welches nach Entfernung des Eisens Bernsteinsäure liefert,³⁾ — ein Moment, das bisher, meines Wissens, noch von keiner Seite herangezogen worden ist.

Auf Grund letzterer Tatsache, die ich selbst nachgeprüft habe (Vers. Fr. F. 2 u. 2a), griff ich das Problem, Bernstein-

¹⁾ Micko, Chem. Centralbl., 1905, Bd. 2, S. 1379; 1906, Bd. 2, S. 625. — Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 208 (1908). — E. Baur und Barrschall, Chem. Centralbl., 1906, Bd. 2, S. 1351; 1911, Bd. 2, S. 1367

²⁾ l. c.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 383 (1895/6).

säure aus frischem Fleisch zu isolieren, erneut auf. Meine Erfahrungen mit den Schwierigkeiten der Isolierung der Bernsteinsäure (siehe Methodik) ließen mich hoffen, zu einwandfreien Resultaten zu gelangen. Der Versuch bestätigte meine Voraussetzung, daß frisches Fleisch ebenso wie Fleischextrakt (Liebig) Bernsteinsäure liefert. Es konnten isoliert werden aus 1,8 kg Rindfleisch (48 Stunden nach Schlachtung) 0,133 g (Vers. Fr. F. 7) und aus 1,75 kg Rindfleisch (von demselben Tier wie oben, 7 Tage später, also 9 Tage nach Schlachtung) 0,122 g (Vers. Fr. F. 8). Zum Vergleich füge ich hier die Zahlen für Fleischextrakt an, der nach derselben Isolierungsmethode verarbeitet wurde. 50 g Extrakt gaben 0,147, resp. 0,150 g. (Vers. L. F. E. 31 u. 32.) Da nun beim Rindfleisch die Versuche mit Fleisch, das 48 Stunden, resp. 9 Tage nach der Schlachtung zur Verarbeitung kam, angestellt wurden, also hier der Einwand der postmortalen Entstehung nicht ausgeschlossen war, konnte bei einem Hunde das Muskelfleisch ca. 2 Stunden nach der Tötung des Tieres zur Verarbeitung angesetzt werden. (Vers. Fr. F. 9.) Auch bei diesem Versuche wurde Bernsteinsäure isoliert, und hier sogar erheblich mehr, als im Rindfleisch gefunden worden war, nämlich aus 1,5 kg 0,240 g Bernsteinsäure. (Vers. Fr. F. 9.) Nicht unerwähnt möchte ich an dieser Stelle eine Mitteilung von Behre lassen, daß Bernsteinsäure in Leichenteilen von Hunden, die an Kleesalzvergiftung eingegangen waren, vorkommt.¹⁾

Obgleich meine Befunde durchaus eindeutig sind, sollen doch noch weitere Versuche angestellt werden, einmal um die bisherigen Resultate zu bestätigen, und dann um zu untersuchen, ob sich zwischen Extrakten von Muskeln verschiedener Tierarten und auch von verschiedenen Organen quantitative Differenzen an Bernsteinsäuregehalt ergeben.

Eine genaue Prüfung meines Befundes erscheint um so mehr geboten, als derselbe im Widerspruch steht zu den Mitteilungen von Batelli und Stern,²⁾ die bewiesen haben wollen, daß Bernsteinsäure durch frisches Muskelgewebe zu Äpfelsäure

¹⁾ Chem. Zeitung. Bd. 36. S. 933 (1912).

²⁾ Biochem. Zeitung. Bd. 30. S. 172 (1901).

oxydiert wird. Wenn diese Angabe als richtig vorausgesetzt wird, so hätte man bei der Extraktion der frischen Muskeln anstelle von Bernsteinsäure Äpfelsäure oder doch ein Gemisch beider Säuren erwarten sollen.

Der Beweis, den Batelli und Stern für die Überführung der Bernsteinsäure in Äpfelsäure durch die Gewebeatmung beibringen,¹⁾ kann als solcher nicht anerkannt werden. Die Verfasser fällen das Reaktionsgemisch nach der Koagulation der Eiweißstoffe mit Bleiacetat, zersetzen den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, geben Baryumhydrat hinzu und dampfen das Filtrat ein. Ein in weißen Plättchen anschließendes Baryumsalz soll das Vorhandensein von Äpfelsäure (frei von Bernsteinsäure?) beweisen. Dieses Baryumsalz (ohne Analyse) beweist an sich gar nichts, denn Bernsteinsäure wird ebenso wie Äpfelsäure durch Bleiacetat gefällt und gibt genau wie diese ein Baryumsalz.

Immerhin legte die Arbeit von Batelli und Stern nahe, die aus frischem Fleisch isolierte Bernsteinsäure auf den Gehalt von Äpfelsäure zu prüfen. Leider existiert bisher noch keine Methode, die gestattet, die beiden Säuren durch die verschiedene Löslichkeit von Salzen oder dergleichen einwandfrei oder auch nur annähernd zu trennen. Es mußten daher einstweilen die kolorimetrischen Methoden nach Pinerua (Färbung mit β -Naphthol in konzentrierter Schwefelsäure)²⁾ und Rosenthaler (Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure)³⁾ genügen, um Anhaltspunkte für die mögliche Anwesenheit von Äpfelsäure in den Mutterlaugen der Bernsteinsäure zu bieten. Die Untersuchung der in Wasser am leichtesten löslichen Anteile der gefundenen Bernsteinsäuremengen zeigte (namentlich bei dem Versuch mit Hundefleisch), daß mit β -Naphthol in konzentrierter Schwefelsäure eine gelbe Lösung mit stark grüner Fluorescenz und mit Diazobenzolsulfosäure Rotfärbung eintritt, so daß die Möglichkeit für die Anwesenheit geringer Mengen Äpfelsäure vorliegt. Ich möchte aber die Entscheidung über diesen Punkt weiteren

¹⁾ Biochem. Zeitung, Bd. 30, S. 177 (1910).

²⁾ C. r. de l'Acad. d. Sc., Bd. 124, S. 292 (1897).

³⁾ Chem. Zeit., Bd. 36, S. 830 (1912).

Versuchen mit größeren Materialmengen vorbehalten. Mit der Ausarbeitung einer Trennungsmethode der beiden Säuren bin ich einstweilen noch beschäftigt.

Zum Schlusse meiner Ausführungen möchte ich nicht verfehlen, auf die einwandfreien Befunde von Thunberg¹⁾ sowohl wie von Batelli und Stern²⁾ hinzuweisen, die zeigen, daß die Bernsteinsäure den respiratorischen Gaswechsel der Gewebe stark beeinflußt, und zwar wird die Sauerstoffaufnahme vermehrt, die Kohlensäurebildung dagegen vermindert. Ich glaube, daß gerade hinsichtlich dieser Tatsache die Isolierung von Bernsteinsäure aus frischem Muskelgewebe interessante Perspektiven eröffnet.

Methodik.

Zur Darstellung von Extrakten aus frischem Fleisch wurden die durch die Hackmaschine zerkleinerten Muskeln nacheinander 2 mal mit je der doppelten Menge und darauffolgend mit der einfachen Menge Wasser bei einer Temperatur, die 60° nicht wesentlich überschritt, je 30 Minuten digeriert und durch Koliertuch abfiltriert. Der zurückbleibende Fleischbrei wurde zum Schluß gut abgepreßt. Die vereinigten Filtrate erhält man 30 Minuten in lebhaftem Sieden, wobei die darin enthaltenen Eiweißkörper koagulieren und sich gut absetzen. Nach dem Filtrieren wird auf dem Wasserbade eingedampft.

Zur Gewinnung der Bernsteinsäure wurden die so erhaltenen Extrakte, ebenso wie die zu untersuchenden Fleischextrakte (Liebig), in zirka der 10fachen Menge 10%iger Schwefelsäure gelöst, und dann mit soviel festem Ammonsulfat versetzt, daß eine 50%ige Lösung resultiert. (Auf 600 ccm Lösung 300 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Es entsteht dabei eine ziemlich erhebliche grobkörnige Fällung. Das Gemisch wurde quantitativ in einen Extraktionsapparat nach Zelmanowitz³⁾ übergeführt und

¹⁾ Skandin. Arch. f. Physiol., Bd. 22, S. 430 (1909), Bd. 24, S. 23 (1910); Bd. 25, S. 42 (1911).

²⁾ Biochem. Ztg., Bd. 30, S. 172 (1911).

³⁾ Biochem. Ztschr., Bd. 1, S. 253 (1906).

während ca. 24 Stunden durch eine Mischung von 9 Teilen Äther und 1 Teil Alkohol erschöpft. Der alkoholisch-ätherische Auszug wurde durch ein trockenes Filter gegossen und dann vorsichtig, eventuell nach Zugabe von etwas Wasser, auf dem Wasserbade abgedampft. Den ziemlich erheblichen Destillationsrückstand, der stets stark getrübt war, versetzte ich mit 200 ccm Wasser und erhielt das Ganze auf dem Sandbade im Sieden, bis etwa die Hälfte der Lösung verdampft war. Dabei klärt sich die Lösung, während das bei der Extraktion in den Äther-Alkohol übergegangene Fett sich in Tröpfchen abscheidet. Nach dem Stehen über Nacht konnte die Lösung leicht klar filtriert werden. Das Filtrat wurde sodann mit einigen Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzt, und nun solange heißgesättigte Barythydratlösung hinzugefügt, bis dauernde Rotfärbung eintrat. Den Überschuß an Baryt entfernte ich durch Einleiten von Kohlensäure und dampfte die Lösung nach dem Filtrieren ein. Beim Aufnehmen des zähflüssigen Rückstandes mit ca. 50 ccm Wasser zeigte sich ein feinpulvriger Rückstand (Rückstand I). Es ergab sich, daß derselbe zum großen Teil aus bernsteinsaurem Baryum bestand, das durch das Eindampfen wasserunlöslich geworden war. (Vgl. Siegfried¹⁾). Derselbe wurde abfiltriert und das Filtrat im Meßzylinder aufgefangen. Zur Weiterverarbeitung zersetzte ich den Niederschlag mit 10%iger Schwefelsäure, überführte das Gemisch quantitativ in einen Extraktionsapparat nach Kumagawa²⁾ und erschöpfte mit alkoholfreiem Äther. Der nach dem Verdampfen des Äthers zurückbleibende kristallinische Rückstand wurde, wie später beschrieben, in das Silber-salz übergeführt und hieraus die Bernsteinsäure dargestellt.

Das Filtrat vom Rückstand I brachte ich auf ein gemessenes Volumen, z. B. 60 ccm, und fällte mit Alkohol. Hierbei zeigte es sich, daß häufig eine Konzentration von 80%, also auf 60 ccm Lösung + 240 ccm Alkohol abs., die nach den bisherigen Angaben genügen sollte, alle vorhandene Bernsteinsäure als Baryumsuccinat auszufällen, nur eine geringe milchige Trübung der Flüssigkeit, öfters überhaupt keine Fäl-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 371 (1895/6).

²⁾ Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 4, S. 185 (1903).

lung hervorbrachte. Selbst wenn bei einer Konzentration von 80% eine erhebliche Fällung (Rückstand II) eintrat, so ergab es sich, daß damit doch nicht alle Bernsteinsäure als Baryumsalz niedergeschlagen war. Zum Beweise führe ich hier die Zahlen von Versuch Fr. F. 9 an. Dabei ergaben Rückstand I = 0,042 g, Rückstand II (80% Alk.) = 0,124 g und Rückstand III (90% Alk.) = 0,0855 g Bernsteinsäure.

Nachdem ich diese Beobachtung gemacht hatte, wurde, wenn die Fällung durch 80%igen Alkohol unerheblich war, weiter Alkohol hinzugefügt bis zu einer Konzentration von 90% (auf 60 ccm Lösung 540 ccm Alkohol abs.); dabei entstand dann eine dichte klebrige Fällung, die sich über Nacht am Boden und an den Wänden des Fällungszylinders absetzte (Rückstand III). Die überstehende Lösung konnte leicht abgossen werden und enthielt keine oder nur geringe Spuren von bernsteinsaurem Baryum.

Die Aufarbeitung der durch Alkohol erhaltenen Fällungen wurde zunächst so durchgeführt, wie C. von der Heide und H. Steiner dieses vorschreiben.¹⁾ Dazu wurden die Niederschläge, nachdem sie mit Alkohol der entsprechenden Konzentration abgespült waren, in Wasser aufgenommen, in einer Porzellanschale eingedampft, wieder in Wasser gelöst und nun mit Kaliumpermanganatlösung so lange versetzt, bis dauernde Rotfärbung entstand. Dann wurde mit schwefliger Säure entfärbt und der Mangansuperoxydniederschlag gelöst. Das so erhaltene Gemisch konzentrierte ich auf dem Wasserbade, überführte es quantitativ in einen Extraktionsapparat nach Kumagawa, brachte die Lösung auf eine Schwefelsäurekonzentration von 10% und erschöpfte mit alkoholfreiem Äther. Nach dem Verdampfen des Äthers hinterblieb hierbei die Bernsteinsäure meist sehr stark gefärbt und sehr verschmiert. Es genügte zwar einmaliges Umkrystallisieren aus Wasser, um Krystalle von dem richtigen Schmelzpunkte zu erhalten, aber das Verfahren erschien mir doch nicht einwandfrei, da bei der Fällung mit 90%igem Alkohol zuviel andere Bestandteile der Lösung

¹⁾ Zeitschr. f. Unters. v. Nahr. u. Genusm., Bd. 17, S. 291 (1909).

Zeitschr. f. anal. Chemie, Bd. 51, S. 628 (1912).

außer dem Baryumsuccinat niedergeschlagen werden, durch deren Oxydationsprodukte dann die Bernsteinsäure verunreinigt wird.

Ich änderte deshalb die Aufarbeitung der Niederschläge II und III dahin ab, daß dieselben zunächst mit Wasser aufgenommen und in einer Porzellanschale eingedampft wurden. Den Rückstand rührte ich mit 5—10 ccm 40%iger Schwefelsäure an, gab je nach der Menge 2—5 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzu und vermischte den so erhaltenen Brei solange mit wasserfreiem Natriumsulfat, bis ein lockeres Pulver entstand. Dasselbe wurde 24—48 Stunden im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet und dann im Soxhlet mit Äther erschöpft. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde mit Wasser aufgenommen, eventuell filtriert und eingedampft. Es resultierte so ein sirupöser Rückstand, der namentlich nach einem Aufenthalt im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure mit Krystallen durchsetzt war. Derselbe wurde in wenig Wasser (10—20 ccm) aufgenommen und mit 10%iger Silbernitratlösung versetzt. Es entstand dabei meist ein geringfügiger, flockiger Niederschlag, der abfiltriert wurde. Das Filtrat versetzte ich vorsichtig, tropfenweise, solange mit verdünntem Ammoniak, bis die Lösung ganz schwachsauer bis neutral reagierte. Hierbei fiel das bernsteinsäure Silber körnig aus, so daß es sich sehr bald klar absetzte. Um zu sehen, ob die Fällung vollständig ist, empfiehlt es sich, einige Tropfen der überstehenden Flüssigkeit mit einem Tropfen einer 1%igen Bernsteinsäure-Lösung zu versetzen. Es muß dabei sofort oder mindestens nach kurzem Schütteln der charakteristische Niederschlag von bernsteinsäurem Silber entstehen. Nach dem Stehen über Nacht wurde filtriert, mit Wasser vorsichtig gewaschen (Löslichkeit des Silbersuccinats bei 18° 0,0176 g in 100 ccm H₂O)¹⁾ und das Silbersalz durch Schwefelwasserstoff zersetzt.

Man erhält auf diesem Wege die Bernsteinsäure sofort krystallinisch, und nach dem Trocknen auf Ton zeigte sie den Schmelzpunkt 180—182° unkorrr. Sollte die Säure noch nicht

¹⁾ Partheil und Hübner. Arch. d. Pharm., Bd. 241, S. 412 (1903).

Tabelle I.

Versuch Nr.	Material und angewendete Menge		Unter- suchter Anteil	Menge g	P %	Fe %	Bernstein- säure		
							g	%	
L. F. E. 8	300 g	Liebig'scher Fleischextrakt A.	Carniferrin	30,0	1,08	24,0	0,1360	0,45	
			Fällung II	—	—	—	0,3720	—	
			Mutterlauge	—	—	—	0,1710	—	
L. F. E. 13	150 g	dito	Carniferrin	16,5	1,07	31,8	0,0702	0,43	
			Fällung II	83,5	Spur	51,2	0,3170	0,38	
			Mutterlauge	—	—	—	0,1090	—	
L. F. E. 19	200 g	dito	Carniferrin	19,5	1,40	30,05	0,1005	0,52	
			Fällung II	88,5	0,12	49,30	0,3490	0,39	
			Mutterlauge	—	—	—	0,2632	—	
L. F. E. 25	200 g	dito	Carniferrin	18,0	1,32	32,22	0,0999	0,55	
			Fällung II	125,0	Spur	50,10	0,5550	0,44	
			Mutterlauge	—	—	—	0,2540	—	
L. F. E. 31	50 g	dito	B.	Gesamt	—	—	—	0,1470	—
L. F. E. 32	50 g (44)g			»	—	—	—	0,1500	—
L. F. E. 33	200 g (176)g	dito	Carniferrin	20,7	1,12	31,9	0,072	0,35	
			Fällung II	126,0	0,03	51,7	0,450	0,36	
			Mutterlauge	verloren gegangen					
L. F. E. 41	150 g (125)g	dito	Gesamt	—	—	—	0,387	—	
L. F. E. 34	20 g			»	enthielten 0,0318 g organischen Phosphor.				

Tabelle II.

Versuch Nr.	Material und angewendete Menge		Unter- suchter Anteil	Menge g	P %	Fe %	Bernstein- säure				
							g	%			
Fr. F. 1	1,9 kg	frisches Rindfleisch A.	Gesamt	—	—	—	ca. 0,125	—			
Fr. F. 2	1,9 kg	dito	B.	Carniferrin	9,3	1,11	37,1	0,046	0,49		
Fr. F. 3	1,9			»	C.	»	10,2	1,26	35,15	0,033	0,32
						Fällung II	70,0	Spur	57,4	0,096	0,13
				Mutterlauge	—	—	—	—			
Fr. F. 7	1,8	»	D.	Gesamt	—	—	—	0,133	—		
Fr. F. 8	1,75			»	D.	—	—	—	0,122	—	
Fr. F. 9	1,5	»	Hundefleisch	»	—	—	—	0,240	—		

Bemerkungen zu den Tabellen.

Die Versuche L. F. E. 8, 13, 19, 25 wurden ausgeführt mit Fleischextrakt (2 kg), die mir die Liebig-Gesellschaft zur Verfügung gestellt hatte, wofür ich derselben auch hier danken möchte. Die Steigerung an isolierter Bernsteinsäure ist ziemlich beträchtlich. Vers. 8 ergibt auf 50 g Fleischextrakt 0,1133 g, Vers. 25 dagegen 0,2272 g. Es könnte hieraus eventuell der Schluß gezogen werden, daß sich die Bernsteinsäure im Fleischextrakt während der Lagerung durch irgend welche Prozesse anreichert. Ich glaube aber nicht, daß dieses der Fall ist, denn die Versuche L. F. E. 31, 32, 33 und 41 beweisen das Gegenteil. Sie wurden alle mit demselben Fleischextrakt, aus einer $1\frac{1}{2}$ kg-Dose stammend, angestellt. Zwischen dem ersten (31) und letzten (41) Versuch liegen ca. 8 Monate. Während dieser Zeit wurde die verschlossene Büchse im Brutschrank bei 40° ohne Vorsichtsmaßregeln aufbewahrt. Der Extrakt verlor dabei beträchtlich an Gewicht (16,6%). Die Zahlen der Tabelle sind auf das ursprüngliche Gewicht bezogen, das effektive Gewicht geben die eingeklammerten Zahlen. Eine Vermehrung der Bernsteinsäure konnte dieses Mal, wo die Eintrocknung berücksichtigt und nach einwandfreier Methode gearbeitet wurde, nicht beobachtet werden. Die Vermehrung in den früheren Versuchen möchte ich daher zurückführen einmal auf die Eintrocknung und dann auf die weiter vorn (S. 154-55) geschilderte Möglichkeit für die Entstehung von Verunreinigungen bei der Aufarbeitung des Baryumsalzniederschlags durch Oxydation mit Permanganat.