

## Zur Kenntniss der Phosphorfleischsäure.

Von

**M. Siegfried.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Institutes der Universität Leipzig.  
(Der Redaction zugegangen am 9. December 1895.)

In einer «Ueber Fleischsäure»<sup>1)</sup> überschriebenen Abhandlung habe ich gezeigt, dass sich aus Muskelextracten nach Entfernung der Phosphate durch Barythydrat mittelst Eisenchlorid in der Hitze eine in Wasser unlösliche, in Alkalien leicht lösliche, phosphorhaltige Eisenverbindung, das Carniferrin, gewinnen lässt. Aus dieser entsteht durch Zersetzen mit Barythydrat das Barytsalz der Fleischsäure  $C_{10}H_{15}N_3O_8$ , einer einbasischen Säure, deren Untersuchung Gegenstand angeführter Arbeit war und zur Erkenntniss der Identität derselben mit dem Antipepton führte.

Aus den Analysen der ersten Präparate Carniferrin konnte nicht mit Sicherheit der Schluss gezogen werden, dass dasselbe ein Individuum, ein Product von constanter Zusammensetzung sei. Die etwas abweichende Zusammensetzung mehrerer Präparate erklärte sich aus dem Umstande, dass unter anderen, an oben citirter Stelle mitgetheilten Bedingungen ein Eisenniederschlag von wesentlich höherem Eisengehalte als demjenigen des Carniferrins entsteht, welcher diesem leicht

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abthlg. 1894, S. 401.

in sehr geringer, aber doch die Analysenresultate zu stark beeinflussender Menge beigemischt ist. Das weitere Studium der Reaction hat ermöglicht, reines Carniferrin von constanter Zusammensetzung darzustellen und dasselbe in verschiedenen thierischen Flüssigkeiten und Extracten quantitativ zu bestimmen. Hierdurch konnten über die Natur der Phosphorfleischsäure, ihr Vorkommen und ihre physiologische Bedeutung nähere Aufschlüsse gewonnen werden.

### I. Das Carniferrin.

**Darstellung:** Zur Gewinnung eines reinen Productes in quantitativer Ausbeute wurde das früher<sup>1)</sup> beschriebene Verfahren dahin abgeändert, dass die Phosphate der Muskel-extractlösungen nicht durch Barythydrat, sondern durch Chlorcalcium und Ammoniak gefällt wurden. Man setzt solange abwechselnd die Lösung des Chlorids und Ammoniaks unter fortwährender Neutralisation der entstehenden sauren Reaction hinzu, bis bei schwach alkalischer Reaction durch Chlorcalcium kein Niederschlag entsteht. Hierauf wird filtrirt, Eisenchlorid hinzugegeben und gekocht. Während des Kochens stumpft man die saure Reaction bis zur schwach sauren mit Ammoniak ab und fährt mit dem Zusatze von Eisenchlorid unter erneuter Abstumpfung mit Ammoniak solange fort, bis eine filtrirte Probe nach stärkerem Ansäuern die Ferrireaction mit Rhodankalium oder Ferrocyankalium schwach liefert. Das entstandene Carniferrin wird abgenutscht, bis zur Chlorfreiheit gewaschen und wenn es zersetzt werden soll, feucht weiter verarbeitet, sonst auf der Nutsche mit Alkohol und dann mit Aether gewaschen und an der Luft getrocknet. Beim Trocknen auf dem Wasserbade wird es zwar nicht zersetzt, ballt sich aber zu einer harten, schwer pulverisirbaren Masse zusammen, während es durch Trocknen mit Alkohol und Aether als leichtes, feines Pulver erhalten wird.

**Zusammensetzung:** Bei folgenden Analysen wurde zur Eisenbestimmung die bei  $105^{\circ}$ — $108^{\circ}$  bis zum constanten

<sup>1)</sup> L. c., S. 402.

Gewichte getrocknete Substanz im Platintiegel verascht, die Asche mit Salzsäure gelöst und letztere durch Abrauchen mit Schwefelsäure völlig entfernt. Der Rückstand wurde in verdünnter Schwefelsäure gelöst und das Eisen nach Reduction mittelst reinen granulirten Zinkes mit Kaliumpermanganatlösung, von welcher 1 cbcm. = 0,00579 gr. Fe entsprach, titirt. Der Titer der in einer braunen Flasche aufbewahrten Chamaeleonlösung wurde mehrfach controlirt und constant gefunden.

Zur Phosphorbestimmung wurde die ebenso getrocknete Substanz in einer geräumigen Silberschale mit Aetznatron und Salpeter verschmolzen, aus der wässerigen Lösung der Schmelze nach Uebersättigen mit Salpetersäure und Erhitzen auf dem Wasserbade bis zur klaren Lösung die Phosphorsäure mit molybdänsaurem Ammon gefällt und als pyrophosphorsaure Magnesia gewogen.

Die C-, H- und N-Bestimmungen, welche hier und weiter unten mitgetheilt werden, hat Herr Dr. P. Balke mit unermüdlichem Eifer ausgeführt, wofür ihm auch an dieser Stelle gedankt sei.

#### Analysen:

I.	0,2270 gr.	S gaben	0,0662 gr.	H <sub>2</sub> O	und	0,1886 gr.	CO <sub>2</sub> .
II.	0,1645	» »	erforderten	8,5 cbcm.	Permanganatlösung.		
III.	0,2872	» »	gaben	13,6 cbcm.	N bei 16°	und	752,6 mm. Bar.
IV.	0,2658	» »	»	0,0800 gr.	H <sub>2</sub> O	und	0,2238 gr. CO <sub>2</sub> .
V.	1,2520	» »	»	0,0890	»	P <sub>2</sub> Mg <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .	
VI.	1,6438	» »	»	0,1083	»	P <sub>2</sub> Mg <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .	
VII.	0,2103	» »	erforderten	10,3 cbcm.	Permanganatlösung.		
VIII.	0,1904	» »	»	8,6	»	»	»
IX.	0,2140	» »	gaben	0,0502 gr.	H <sub>2</sub> O	und	0,1756 gr. CO <sub>2</sub> .
X.	0,2726	» »	»	0,0714	»	H <sub>2</sub> O	» 0,2220 » CO <sub>2</sub> .
XI.	1,3691	» »	»	0,1027	»	Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .	
XII.	0,1061	» »	erforderten	5,4 cbcm.	Permanganatlösung.		
XIII.	0,4760	» »	»	17,9	»	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 Normal (Kjeldahl).
XIV.	1,3501	» »	gaben	0,1257 gr.	Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .		
XV.	0,4528	» »	erforderten	17,6 cbcm.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 Normal	(Kjeldahl).
XVI.	0,4270	» »	»	16,9	»	»	0,1 » »
XVII.	0,3062	» »	»	13,2	»	»	0,1 » »
XVIII.	0,5388	» »	»	22,8	»	»	0,1 » »

### Analysenwerthe des Carniferrins.

No.	% C.	% H.	% N.	% Fe.	% P.	Bemerkungen.
I.	22,66	3,24	—	—	—	} Aus Kemmerich-Extract, Präparat I.
II.	—	—	—	29,92	—	
III.	—	—	5,54	—	—	} Aus Kemmerich-Extract, Präparat II.
IV.	22,97	3,35	—	—	—	
V.	—	—	—	—	2,00	} Aus Kemmerich-Extr., Pröp. III.
VI.	—	—	—	—	1,84	
VII.	—	—	—	28,36	—	} Aus Kemmerich-Extract, Präparat IV.
VIII.	—	—	—	28,45	—	
IX.	22,39	2,61	—	—	—	} Aus Liebzig-Extract, Präparat I.
X.	22,21	2,92	—	—	—	
XI.	—	—	—	—	2,06	} Aus Liebzig-Extract, Präparat I.
XII.	—	—	—	29,46	—	
XIII.	—	—	5,48	—	—	} Aus Liebzig-Extract, Pröp. II.
XIV.	—	—	—	—	2,59	
XV.	—	—	5,45	—	—	} Aus der Leber des Pferdes.
XVI.	—	—	5,50	—	—	
XVII.	—	—	6,03	—	—	Aus der Leber des Hundes.
XVIII.	—	—	5,92	—	—	Aus dem Herzen des Hundes.

Aus diesen bei den verschiedensten Präparaten gewonnenen Analysenwerthen ist in Anbetracht, dass das Carniferrin nicht durch Lösen und Fällen gereinigt werden kann, zu schliessen, dass das Carniferrin eine einheitliche Verbindung ist. Dieser Schluss findet eine wesentliche Bekräftigung in der weiter unten auszuführenden Thatsache, dass dieselbe Verbindung von derselben Zusammensetzung, demselben Verhalten auf ganz anderem Wege, aus der Milch, erhalten werden kann. Eine empirische Formel aus den gefundenen Zahlen aufzustellen, halte ich nicht für thunlich, solange Grösse und Constitution des Moleküls nicht sicher gestellt sind.

#### II. Zusammensetzung der Phosphorfleischsäure.

Aus den für die Eisenverbindung erhaltenen Analysenzahlen lässt sich für die Phosphorfleischsäure selbst keine Formel entwickeln, weil die Vertheilung des Sauerstoffs auf

Eisen und Kohlenstoff nicht festzustellen ist. Wohl aber lehren die Zahlen, dass die Phosphorfleischsäure nicht eine einfache Aetherphosphorsäure der Fleischsäure sein kann, da in der Fleischsäure das Verhältniss C:N = 2,85 in dem Carniferrin 4,04 ist. Alle Versuche, welche zur Reindarstellung der Phosphorfleischsäure aus dem Carniferrin während zwei Jahren unter Einschlagung der verschiedensten Wege gemacht wurden, führten zu der Ueberzeugung, dass eine Entfernung des Eisens ohne völlige Vermeidung der Abspaltung von Phosphorsäure unausführbar ist. Hingegen zeigten sie, dass eine Phosphorfleischsäure, aus welcher nur die Phosphorsäure ganz oder theilweise abgespalten ist, darstellbar ist.

Versuch I. 100 gr. Carniferrin wurden in 3 Liter 3,3 procentiger Sodalösung  $\frac{1}{2}$  Stunden gekocht. Es wurde filtrirt, das Filtrat nach Neutralisation mit Essigsäure auf dem Wasserbade eingeeengt und mit klarer Aetzbarytlösung versetzt. Es entstand ein grossflockiger Niederschlag, der centrifugirt, zweimal mit schwach essigsauerm Wasser und darauf häufig mit 50procentigem Alkohol, dem einige Tropfen Essigsäure zugesetzt waren, auf der Centrifuge ausgewaschen wurde. Mit absolutem Alkohol und darauf Aether gewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure bis zum constanten Gewichte getrocknet, gab die Substanz folgende Zahlen bei der Analyse:

- I. 0,2854 gr. S. gaben 0,1722 gr. BaSO<sub>4</sub>.
- II. 0,2744 » » » 14,4 cbcm N bei 19° und 755,7 mm. Bar.
- III. 0,2310 » » » 0,0598 gr. H<sub>2</sub>O und 0,2160 gr. CO<sub>2</sub>.
- IV. 0,2068 » » » 0,0538 » » » 0,1944 » »
- V. 1,3715 » » » 0,0663 » Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

G e f u n d e n :

	C.	H.	N.	Ba.	P.
I.	—	—	—	35,48 %	—
II.	—	—	6,13 %	—	—
III.	25,50 %	2,88 %	—	—	—
IV.	25,63 %	2,89 %	—	—	—
V.	—	—	—	—	1,35 %

Das Verhältniss von C:N = 4,17 in dieser Barytverbindung stimmt sehr gut mit dem in dem Carniferrin C:N = 4,04 überein und unterscheidet sich wesentlich von dem

in der Fleischsäure  $C:N = 2,85$ , sodass man diese Substanz mit Recht als eine Barytverbindung der Phosphorfleischsäure, aus welcher die Phosphorsäure ganz oder theilweise abgespalten ist, auffassen kann. Der bei der Analyse gefundene Phosphor kann ganz oder theilweise von Baryumphosphat herrühren.

Thatsächlich liess sich aus dieser Barytverbindung Fleischsäure darstellen: 10 gr. dieser Substanz wurden mit 200 ccm. einer 10procentigen Aetzbarytlösung eine halbe Stunde gekocht; im Filtrate wurde der Baryt durch einen kleinen Ueberschuss Schwefelsäure gefällt, das Filtrat vom Baryumsulfat 8 Mal mit dem gleichen Volumen Aether extrahirt und nach genauer Ausfällung der Schwefelsäure durch Barytwasser zum kleinen Volumen auf dem Wasserbade eingeengt. Durch Alkohol wurde eine Säure gefällt, welche die Reactionen und das Silbersalz der Fleischsäure lieferte.

0,1460 gr. S. gaben 0,0676 gr. Ag.

	Gefunden:	Berechnet
		für $C_{10}H_{13}N_3O_5Ag_2$ :
Ag	46,30 %	45,86 %

[Da ich bei Darstellung kleiner Mengen schwerlöslicher Salze zur Vermeidung eines Filters das ausgeschiedene Salz mit Wasser und Alkohol und schliesslich Aether decantire, erhalte ich so das wasserfreie Silbersalz der Fleischsäure (vergl. auch C. W. Roekwood: Ueber das Vorkommen der Fleischsäure im Harne<sup>1</sup>).]

Der Aetherextract enthielt Säuren, welche ebenfalls als Zersetzungsproducte der Phosphorfleischsäure aufzufassen sind (s. w. u.).

Versuch II. 500 gr. frisch gefälltes Carniferrin wurde mit Baryhydrat bei  $50^\circ$  behandelt. Aus dem barytalkalischen Filtrate wurde bei gewöhnlicher Temperatur der Baryt mit Schwefelsäure genau ausgefällt, das Filtrat vom Baryumsulfat bei niederer Wasserbadtemperatur eingeengt und unter Umrühren in absoluten Alkohol gegossen. Die ausgeschiedene

<sup>1</sup>) Arch. f. Anat. und Physiol., Physiol. Abthlg., 1895, S. 3.

Substanz wurde abgesaugt, anhaltend mit Alkohol und darauf mit Aether gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Analysen:

- I. 0,4095 gr. S. gaben 0,0301 gr.  $Mg_2P_2O_7 = 2,05\%$  P.  
 II. 0,3276 » » » (nach Kjeldahl) 0,0469 gr. N = 14,32 %.

Der Stickstoffgehalt war also wesentlich geringer als der der Fleischsäure (16,33%); der Phosphor ist als der Phosphorfleischsäure zugehörig zu betrachten, weil die Phosphorsäure mit Barythydrat gefällt war. War wirklich Phosphorfleischsäure vorhanden, so musste sich aus ihr wieder Carniferrin darstellen lassen. Dies war der Fall.

5 gr. Substanz wurden in 800 ccm. Wasser gelöst, mit Ammoniak neutralisirt und mit etwas Eisenchlorid auf dem Wasserbade erwärmt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und bis zur Chlorfreiheit gewaschen. Er war völlig löslich in Alkalien, die alkalische Lösung gab die Reactionen alkalischer Carniferrinlösungen; ebenso ging aus den Analysen die Identität mit Carniferrin hervor.

- I. 0,3056 gr. S. gaben 0,0950 gr.  $H_2O$  und 0,2644 gr.  $CO_2$ .

Der Rückstand im Schiffschen enthielt 0,0885 gr. Fe.

- II. 0,4788 gr. S. gaben 22,2 ccm. N bis  $16^\circ$  und 762 mm. Bar.  
 III. 0,9337 » » » 0,0480 gr.  $Mg_2P_2O_7$ .

G e f u n d e n :

	C.	H.	N.	Fe.	P.
I.	23,59 %	3,45 %	—	28,95 %	—
II.	—	—	5,42 %	—	—
III.	—	—	—	—	1,47 %.

Aus Phosphorsäure, sowohl Ortho- als Metasäure, Fleischsäure und Eisenchlorid entsteht, wie ich früher festgestellt habe, kein dem Carniferrin ähnlicher Körper.

Dieser Versuch zeigt deutlich, dass Phosphorfleischsäure zum Theil unversetzt bei Abspaltung des Eisens aus dem Carniferrin mit Barythydrat bei  $50^\circ$  entsteht.

Es wurde versucht, aus diesem Gemenge von Phosphorfleischsäure und ihren Spaltungsproducten erstere durch Ausfällen mit Ammonsulfat darzustellen. Während bekanntlich Fleischsäure, Antipepton, durch Ammonsulfat nicht fällbar

ist, war zu erwarten, dass die jedenfalls viel höher molekulare Phosphorfleischsäure fällbar sei. Namentlich dies auch deshalb, weil man aus frisch dargestellten Muskelauszügen nach Sättigen mittelst Ammonsulfat keinen peptonartigen Körper auffinden kann, während doch ursprünglich Phosphorfleischsäure vorhanden ist.

Thatsächlich wurde durch Aussalzen der wässerigen Lösung der besprochenen unreinen Phosphorfleischsäure nach W. Kühne's Vorschrift<sup>1)</sup> eine Fällung erhalten, die sich auf dem Filter als klebrige Masse anlegte. Dieselbe wurde in Wasser gelöst und bis zum Ausbleiben der Schwefelsäurereaction dialysirt. Nach Eindunsten der Lösung über Schwefelsäure gab der Rückstand nur eine sehr schwache Phosphorsäurereaction beim Verschmelzen mit Aetznatron und Salpeter, während der Kohlenstoffgehalt (49,62%) wesentlich denjenigen der Fleischsäure (46,69%) übertraf. Es ist also wahrscheinlich, dass die Phosphorfleischsäure durch Ammonsulfat gefällt, dass aber bei dem langen Dialysiren gegen Wasser die Phosphorsäure allmählig fast ganz abgespalten worden ist.

Es ist somit erwiesen, dass die Phosphorfleischsäure keine Aetherphosphorsäure der Fleischsäure ist, sondern ein complicirteres Molekul besitzt, welches ausser den die Fleischsäure bei der Barytspaltung liefernden Complex noch andere, kohlenstoffreichere und stickstoffärmere oder stickstofffreie Gruppen besitzt. Das Studium der übrigen Spaltungsproducte ermöglichte einen Einblick in diese Complexe.

### III. Spaltungsproducte der Phosphorfleischsäure.

#### 1. Fleischsäure.

Ueber diese ist früher<sup>2)</sup> ausführlich berichtet worden. Während über die zur Aufklärung ihrer Constitution im Gange befindlichen Untersuchungen erst später mitgetheilt werden sollen, will ich an dieser Stelle nur ergänzend anführen, dass es jetzt gelungen ist, das Salzsäureadditionsproduct der Fleischsäure rein darzustellen.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol., Bd. 29, S. 1.

<sup>2)</sup> L. c.

10 gr. Fleischsäure wurden in 15 cbem. concentrirter rauchender Salzsäure bei wenigen Graden über 0 gelöst und 6 Tage in der Eiskiste stehen gelassen. Durch Eingiessen in absoluten Alkohol wurden fast weisse Flocken ausgeschieden, die abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet wurden. Auch dieses Product gab in Wasser gelöst mit Silbernitrat keine Fällung. Erst nach längerem Stehen, schneller beim Kochen, namentlich nach Zusatz von Salpetersäure, trat Trübung und Abscheidung von Chlorsilber ein.

0.2025 gr. bis zum constanten Gewichte über  $H_2SO_4$  getrocknete Substanz brauchten nach Kochen mit Aetznatron und Ansäuern mit Salpetersäure 7,30 cbem  $AgNO_3 \frac{1}{10} N$ .

	Gefunden:	Berechnet
		für $C_{10}H_{15}N_3O_5 \cdot HCl$ :
Cl	12,30 %.	12,09 %.

Hierdurch ist von Neuem das mit dem Molekulargewicht übereinstimmende Aequivalentgewicht des Antipeptons, der Fleischsäure, als 257 bestätigt.

Inzwischen hat Sjöqvist<sup>1)</sup> auf ganz anderem Wege als Aequivalentgewicht des durch Pankreasverdauung erhaltenen Antipeptons 250 gefunden, gewiss eine neue Stütze für die Behauptung der Identität von Fleischsäure und Antipepton.

## 2. Kohlensäure.

Phosphorfleischsäure spaltet beim Erhitzen mit verdünnten Mineralsäuren schon unterhalb  $100^\circ$  Kohlensäure ab. In drei Versuchen wurden je 5 gr. Carniferrin mit 1. vierprocentiger Salpetersäure, 2. fünfprocentiger Schwefelsäure, 3. achtprocentiger Salzsäure in einem Kölbchen erhitzt, das mit einer Chlorcalciumröhre, hinter dieser mit einem klares Barytwasser enthaltendem Absorptionsgefässe, verbunden war. Vorher war das System mit kohlensäurefreier Luft gefüllt. Noch

<sup>1)</sup> Skandin. Arch. f. Physiol., Bd. V, S. 277.

vor Beginn des Siedens trübte sich die Barytlösung, um bald einen starken Niederschlag von Baryumcarbonat abzusetzen. In einem vierten Versuche wurden 5 gr. der oben erwähnten Phosphorfleischsäure in verdünnter Salzsäure gelöst erhitzt. Auch hier fand eine starke Abscheidung von Baryumcarbonat in dem Absorptionsgefäße statt. Bei gewöhnlicher Temperatur geht diese Abspaltung von Kohlensäure nur sehr langsam vor sich. Eine Lösung von Carniferrin in verdünnter Schwefelsäure, welche eine Woche bei gewöhnlicher Temperatur im offenen Kölbchen gestanden hatte, gab an durchgeleitete kohlenstofffreie Luft keine Kohlensäure ab, welche sie aber beim Erhitzen abspaltete.

Die Kohlensäure wird also durch einen rein hydrolytischen Vorgang aus der Phosphorfleischsäure abgespalten. Die physiologische Bedeutung dieser Thatsache werde ich weiter unten besprechen.

### 3. Kohlenhydratgruppe.

Durch Erhitzen von Carniferrin, Phosphorfleischsäure oder deren oben besprochenen Barytderivate mit Mineralsäuren, am besten mit 4procentiger Salpetersäure, entsteht eine Fehling'sche Lösung langsam aber stark reducirender Körper. Zersetzte man frisch bereitetes Carniferrin mit starkem Ammoniak auf dem Wasserbade, filtrirte, versetzte das eingeeengte Filtrat mit klarer Barytlösung und erwärmte, so schied sich ein schwer filtrirbarer Niederschlag ab, der mit Natriumcarbonat zersetzt wurde. Aus dieser Lösung wurde nach Neutralisation durch Salzsäure mittelst Chlorbaryums ein Niederschlag erhalten, der stickstofffrei war und ausser geringen Mengen ätherlöslicher Säuren in Alkohol und Aether unlösliche Substanzen enthielt, welche beim Erhitzen mit Säuren einen Kupferoxyd reducirenden Körper abspaltete. Dass sowohl der auf diese Weise als auch aus dem Carniferrin direct und aus der Phosphorfleischsäure erhaltene Körper ein kohlehydratartiger ist, ging aus der Bildung von Furfurol und von Benzoylverbindungen, welche Furfurol lieferten, hervor. Auch wurde durch Phenylhydrazinacetat in geringer Menge

Osazon erhalten, das jedoch nicht rein dargestellt werden konnte, welches aber kein Glucosazon war. Während ich also vorläufig über die Natur dieses Körpers nichts Sicheres sagen kann, steht doch das Vorhandensein eines stickstofffreien, kohlehydratartigen Complexes in der Phosphorfleischsäure fest. Ich hoffe, dass es mir gelingen wird, bei Verwendung sehr grosser Mengen Ausgangsmaterial trotz der grossen Verluste, welche bei der Isolirung dieses Körpers unvermeidlich sind, soviel Substanz zu gewinnen, dass wenigstens durch ihre Spaltungsproducte ihre Natur genau bestimmt werden kann.

#### 4. Bernsteinsäure und Paramilchsäure.

Durch Extraction der Mutterlaugen, welche bei der Darstellung der Fleischsäure aus Carniferrin erhalten werden, mit Aether gewinnt man stets beträchtliche Mengen Säuren. Nach Abdunsten des Aethers hinterbleibt ein Syrup, aus welchem sehr bald Prismen auskrystallisiren. Durch kalten Aether lassen sich diese Krystalle vom Syrup trennen, welcher nach Verdunsten des Aethers beim Stehen noch mehr Krystalle ausscheidet. Die krystallisirte Säure mehrmals aus heissem Alkohol umkrystallisirt erweist sich als Bernsteinsäure.

#### Analyse:

- I. 0,1754 gr. S. gaben 0,0854 gr.  $H_2O$  und 0,2632 gr.  $CO_2$ .  
 II. (Andere Darstellung) 0,2568 gr. S. gaben 0,1188 gr.  $H_2O$  und 0,3848 gr.  $CO_2$ .

	Gefunden:		Berechnet für $C_4H_6O_4$ :
	I.	II.	
H	5,41 %	5,18 %	5,09 %
C	40,93 »	40,89 »	40,68 »

Präparat I schmolz bei  $179,5^\circ$ , Präparat II bei  $180^\circ$ . Schmelzpunkt der Bernsteinsäure ist  $180^\circ$ .

Die Schmelzpunkte einer grossen Anzahl Präparate, welche bei verschiedenen Darstellungen der Fleischsäure erhalten wurden, lagen zwischen  $179^\circ$  und  $180^\circ$ .

**Löslichkeit:** Eine warm gesättigte wässrige Lösung schied beim Erkalten rasch Krystalle ab und wurde über diesen unter öfterem Umschütteln 7 Tage bei Zimmertemperatur und darauf mehrere Stunden bei  $19^{\circ}$  stehen gelassen. 3,6937 gr. dieser Lösung im Platintiegel bei mässiger Wasserbadtemperatur eingedunstet und über Schwefelsäure bis zur Gewichtsconstanz getrocknet, hinterliessen 0,2178 gr. Säure. 100 chem. Wasser hatten also bei  $19^{\circ}$  6,27 gr. gelöst; nach Carius<sup>1)</sup> lösen 100 Th. Wasser 6,15 Th. Bernsteinsäure bei  $18^{\circ}$ . Die Säure verbrannte auf dem Platinbleche unter Entwicklung der für Bernsteinsäure charakteristischen, stechend riechenden Gase; sie erwies sich als optisch inactiv.

Anfangs war es befremdlich, Bernsteinsäure aus einem löslichen, lange Zeit erwärmten und auch gekochten Barytsalze zu erhalten. Auch liess sich diese Säure leicht in warmem Barytwasser lösen; erst bei anhaltendem Kochen oder tagelangem Erwärmen auf dem Dampfbade schied sich unlöslicher bernsteinsaurer Baryt aus. Wurde dieser mit Schwefelsäure und Aether geschüttelt, so ging in letzteren dieselbe Säure vom gleichen Schmelzpunkte über, welche wiederum ein leicht lösliches Barytsalz bildete.

Parallelversuche mit käuflicher Bernsteinsäure zeigten völlig übereinstimmendes Verhalten derselben. Die Bernsteinsäure bildet also zwei Barytsalze, ein in Wasser leicht lösliches und ein unlösliches. Einen Erklärungsversuch hierfür habe ich an anderer Stelle<sup>2)</sup> gegeben.

Die syrupöse ätherlösliche Säure aus dem Carniferrin ist Paramilchsäure. Die wässrige Lösung der Säure drehte die Ebene des polarisirten Lichtes nach rechts und lieferte ein linksdrehendes Zinksalz von den Formen des Paralactates. Dieses gab mehrmals aus Wasser umkrystallisirt folgende Zahlen bei der Analyse:

- I. Präparat I. 0,2864 gr. S. verl. bei  $105^{\circ}$  0,0368 gr.  $H_2O$  und gaben beim Glühen 0,0846 gr.  $ZnO$ .
- II. Präparat II. 0,5752 gr. S. verl. bei  $105^{\circ}$  0,0744 gr.  $H_2O$ .

<sup>1)</sup> Lieb. Ann., Bd. 142, S. 146.

<sup>2)</sup> Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 28, S. 515.

	Gefunden:		Berechnet:
	I.	II.	für $C_6H_{10}O_6Zn + 2H_2O$ :
H <sub>2</sub> O	12,85 %	12,93 %	12,90 %
Zn	23,67 »	—	23,29 »

III. 0,2368 gr. Substanz bei 105° getrocknet gaben 0,0910 gr. H<sub>2</sub>O und 0,2550 gr. CO<sub>2</sub>.

	Gefunden:	Berechnet
		für $C_6H_{10}O_6Zn$ :
C	29,37 %	29,62 %
H	4,27 »	4,12 »

Es könnte eingeworfen werden, dass diese beiden Säuren nicht Spaltungsproducte der Phosphorfleischsäure seien, sondern dass ihre Eisenverbindungen dem Carniferrin beigemischt seien. Dem ist entgegen zu halten, dass in diesem Falle die Analysenwerthe des Carniferrins so stark beeinflusst würden, dass sie nicht in so engen Grenzen, wie es die Tabelle auf Seite 363 zeigt, in denen sich auch die Analysenwerthe des Carniferrins aus Milch (siehe Seite 374) halten, liegen würden. Denn die Menge der aus dem Carniferrin entstehenden ätherlöslichen Säuren ist nicht unbedeutend. Aus 7 gr. Carniferrin wurden von solchen 0,7 gr. auf Milchsäure berechnet durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure erhalten, und aus 360 gr. Carniferrin (aus 4500 gr. Fleischextract dargestellt) 11 gr. reine Bernsteinsäure dargestellt. Auch ist durch eine bei Salkowski ausgeführte Arbeit von Blumenthal<sup>1)</sup> nachgewiesen worden, dass in frischen Muskelextracten keine Bernsteinsäure vorkommt.

Die Phosphorfleischsäure steht zu den Nucleïnen in naher Beziehung. Sie unterscheidet sich von ihnen in erster Linie dadurch, dass sie bei der hydrolitischen Spaltung unter anderen direct Antipepton, Fleischsäure liefert, während die Nucleïne unter gleichen Umständen Eiweiss bez. demselben sehr nahestehende Hydratationsproducte geben. Ob die spätere Forschung vielleicht auch unter den Nucleïnen solche Körper finden wird, lasse ich dahingestellt, jedenfalls möchte ich die Phosphorfleischsäure wegen dieses Unterschiedes nicht als

<sup>1)</sup> Virchow's Arch., Bd. 137, S. 539.

Nuclein, sondern als ein Nucleon bezeichnen. Dieser Name soll die nahe Verwandtschaft zu den Nucleinen in Bezug auf Eigenschaften und Zusammensetzung und jedenfalls auch auf ihre Entstehung bezeichnen.

#### IV. Phosphorfleischsäure als Bestandtheil der Milch.

Früher<sup>1)</sup> habe ich auf Grund der Fähigkeit der Phosphorfleischsäure, gleichzeitig Phosphorsäure und Metalle wie Eisen und Kalk in (für schwachsaure, neutrale und alkalische Flüssigkeiten) löslicher Form zu enthalten, die Ansicht ausgesprochen, dass die Phosphorfleischsäure ein wichtiges Transportmittel für Phosphorsäure, Eisen, Kalk, Magnesia sei. Diese Vermuthung ist gerechtfertigt worden durch den Befund, dass die Phosphorfleischsäure ein regelmässiger und wesentlicher Bestandtheil der Milch ist. Entfernt man aus der Milch (Kuhmilch) das Casein und die coagulirbaren Eiweisskörper, und behandelt das Filtrat von diesen ebenso wie eiweissfreie Muskelextracte mit Barythydrat, Kalkhydrat oder Chlorcalcium und Ammoniak, so erhält man durch Eisenchlorid in der Hitze einen Niederschlag, der völlig identisch mit dem aus Muskelextracten dargestellten Carniferrin ist. Er löst sich leicht und vollkommen in Alkalien, die Lösungen geben in genügender Verdünnung mit Schwefelammonium keinen Niederschlag und ändern die Farbe nicht, während beim Erhitzen allmählig sich Schwefeleisen bildet. Mit Essigsäure angesäuert geben sie nicht mit Ferrocyankalium die Berlinerblaureaction, welche erst beim Kochen durch Zusatz von Mineralsäuren beschleunigt eintritt.

Die Analysenwerthe stimmen mit denen, welche aus Muskelextracten dargestelltes Carniferrin liefert, überein.

#### Analysen:

- I. 0,2226 gr. S. gaben 0,0618 gr.  $H_2O$  und 0,1844 gr.  $CO_2$ .
- II. 0,4324 » » erforderten 16,05 ccm.  $H_2SO_4$   $\frac{1}{10}$  N. (Kjeldahl).
- III. 0,2154 » » » 11,0 » Permanganatlösung.
- IV. 2,2153 » » gaben 0,1454 gr.  $Mg_2P_2O_7$ .

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abthlg. 1894, S. 401.

- V. 1,7307 gr. S. gaben 0,1222 gr.  $Mg_2 P_2 O_7$ .  
 VI. 1,6030 » » » 0,1139 » »  
 VII. 0,2232 » » » 0,0610 »  $H_2 O$  und 0,1820 gr.  $CO_2$ .  
 VIII. 0,3400 » » » 15,4 cbcm. bei 763,3 mm. Bar. u.  $20^\circ T$ .  
 IX. 2,2880 » » » 0,1662 gr.  $Mg_2 P_2 O_7$ .  
 X. 0,3457 » » » 17,55 cbcm. Permanganatlösung.

### Analysenwerthe des Carniferrins aus Milch.

Nr.	% C.	% H.	% N.	% Fe.	% P.	Bemerkungen.
I.	22,28	3,03	—	—	—	Darstellung I.
II.	—	—	5,19	—	—	
III.	—	—	—	29,56	—	
IV.	—	—	—	—	1,84	
V.	—	—	—	—	1,98	
VI.	—	—	—	—	1,97	
VII.	22,24	3,04	—	—	—	Darstellung II.
VIII.	—	—	5,21	—	—	
IX.	—	—	—	—	2,03	
X.	—	—	—	29,39	—	

Aus dem Carniferrin liess sich Fleischsäure gewinnen und durch ihr Silbersalz charakterisiren.

0,2915 gr. S. gaben 0,1231 gr. Ag = 42,23 %.

Berechnet für  $C_{10}H_{13}N_3O_5Ag_2 + 2H_2O$ : 42,61 %.

Die bei der Extraction der bei der Darstellung der Fleischsäure erhaltenen Mutterlaugen mit Aether gelösten Säuren waren Bernsteinsäure und Milchsäure. Denn die durch kalten Aether aus dem nach Verdunsten des Extractions-Aethers übrigbleibenden Syrupus abgeschiedenen Prismen schmolzen nach mehrmaligem Umkrystallisiren aus heissem Alkohol bei  $180^\circ$ ; die bei einer zweiten Darstellung erhaltenen bei  $179,5^\circ$ . Sie entwickelten beim Verbrennen den charakteristischen, stechenden Geruch, bildeten ein leicht lösliches Barytsalz, das beim Kochen seiner Lösung langsam in das unlösliche überging.

#### Analysen:

0,2678 gr. S. gaben 0,1256 gr.  $H_2 O$  und 0,3994 gr.  $CO_2$ .

	Gefunden:	Berechnet für $C_4H_6O_4$ :
C	40,68 %	40,68 %
H	5,18 »	5,09 »

Die syrupöse Säure war optisch inactiv. Sie wurde in das Zinksalz übergeführt, welches sich ebenfalls optisch inactiv erwies und nach dreimaligem Umkrystallisiren als Zinksalz der Gährungsmilchsäure erkannt wurde.

Analysen:

0,2969 gr. S. verloren bei  $105^{\circ}$  0,0534 gr.  $H_2O$  und hinterliessen beim Glühen 0,0807 gr.  $ZnO$ .

	Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{10}O_6Zn + 3H_2O$ :
$H_2O$	17,99 %	18,18 %
Zn	21,79 »	21,89 »

Der Umstand, dass Bernsteinsäure nach den bisherigen Untersuchungen in der Milch nicht vorkommt, aber bei der Zersetzung des aus Milch dargestellten Carniferrins ebenso wie aus dem aus Muskelextracten dargestellten entsteht, ist ein weiterer Grund für die Annahme der Bildung derselben aus Phosphorfleischsäure durch Hydrolyse.

Während Carniferrin aus Muskelextract Paramilchsäure liefert, gibt das aus Milch dargestellte Gährungsmilchsäure. Es könnte hieraus geschlossen werden, dass die Milchsäure als Eisenverbindung nur eine Verunreinigung des Carniferrins sei. Hiergegen ist geltend zu machen, dass die Gruppe der Phosphorfleischsäure, aus welcher Milchsäure hervorgeht, sei es die Kohlenhydratgruppe oder nicht, bei der aus Milch gewonnenen Phosphorfleischsäure eine stereoisomere derjenigen, welche in Muskelextracten vorhanden ist, sein kann.

Zwei mit je 500 ccm. derselben frisch gemolkene Kuhmilch ausgeführte quantitative Bestimmungen ergaben für einen Liter Milch 1. 0,582 gr., 2. 0,583 gr. Phosphorfleischsäure als Fleischsäure berechnet. Der Gehalt ist also ein so beträchtlicher, dass der Phosphorfleischsäure der Milch mit Recht eine wesentliche Bedeutung für die Resorption des Kalkes der Milch zuzuschreiben ist. Vom klinischen und landwirthschaftlichen Standpunkte wird es wichtig sein, den Einfluss der Nahrung der Thiere, den Einfluss des Sterilisirens der Milch etc. auf den Gehalt der Milch an Phosphorfleischsäure und auf deren Sättigung mit Kalk festzustellen.

## V. Die Phosphorfleischsäure als Energiestoff der Muskeln.

Bei den heute herrschenden abweichenden Ansichten über die Natur der Energiestoffe der Muskeln ist es geboten, jeden neu erkannten Extractivstoff der Muskeln daraufhin zu prüfen, ob er zu dem Stoffwechsel der Muskeln in Beziehung steht, ob er ein Energiestoff oder ein Stoffwechselproduct derselben ist. Zur Entscheidung dieser Fragen betreffs der Phosphorfleischsäure wurden folgende Versuche angestellt.

Versuch I. Einem grossen Hunde, der durch Morphin-Atropin narkotisiert war, wurden an einem Schenkel der Nervus ischiaticus und der Nervus cruralis durchschnitten und durch den Inductionsstrom eines Schlittenapparates, bei welchem der Rollenabstand allmählig verringert wurde, gereizt, sodass sich abwechselnd die Beuger und Strecker im Tetanus befanden. Nach 1 Stunde 50 Minuten wurde das Thier getödtet und die Beuger und Strecker beider Schenkel getrennt zerkleinert. Das Gewicht der ruhenden Muskeln betrug 645 gr., das der müden 640 gr. Jede Muskelmasse wurde gleichzeitig in üblicher Weise mit je 1,5 Liter Wasser und darauf noch zwei Mal jedesmal mit 1 Liter Wasser extrahirt. In diesen Extracten wurde nach Fällung der Eiweisskörper die Phosphorfleischsäure nach der in der folgenden Abhandlung von Balke und Ide beschriebenen Methode bestimmt. In dem Carniferrin wurde stets der Stickstoff entweder nach Dumas oder nach Kjeldahl bestimmt, da mitunter bei der quantitativen Fällung des Carniferrins etwas Eisenoxydhydrat mit ausfällt; der Stickstoff wurde auf Fleischsäure berechnet, erstens, weil für diese der Stickstoffgehalt aus der Formel genau bestimmt ist, zweitens, weil so der Faktor 6,1237, mit welchem die gefundenen Zahlen zu multipliciren sind, kein allzugrosser ist.

Es wurde Phosphorfleischsäure als Fleischsäure berechnet gefunden: Im ruhenden Muskel 1,6193 gr. = 0,24%; im müden Muskel 0,5996 gr. = 0,093%.

Versuch II. Bei einem zweiten grossen Hunde wurden die Nervi ischiaticus und cruralis des einen Schenkels durchschnitten. Nach Verheilung der Wunden wurde das Thier

in möglichst schnellem Tempo 1 Stunde 15 Min. geführt und unmittelbar darauf rasch verblutet.

Gewicht der ruhenden Muskeln: 845 gr.

» » müden » 1010 »

Erste Extraction der Muskelmasse geschah mit je 1500 ccm., zweite und dritte mit je 1000 ccm. Wasser.

Phosphorfleischsäure als Fleischsäure berechnet wurde gefunden:

In den ruhenden Muskeln: 1,1116 gr. = 0,131 %.

» » müden » 0,7344 » = 0,073 »

Versuch III. Der Hund wurde wie in Vers. II operirt. Nach Verheilung der Wunden wurde das Thier 1 Stunde 30 Min. geführt.

Gewicht der ruhenden Muskeln: 955 gr.

» » müden » 1210 »

Erste Extraction der ruhenden Muskeln geschah mit 1500 ccm., der müden mit 1800 ccm., zweite und dritte der ruhenden mit je 1000 ccm., der müden mit je 1200 ccm. Wasser. Phosphorfleischsäure als Fleischsäure berechnet wurde gefunden:

In den ruhenden Muskeln: 0,5463 gr. = 0,057 %.

» » müden » 0,4697 » = 0,039 »

Folgende Tabelle gibt die Zusammenstellung der Resultate:

Versuchsnummer.	Gewicht der Muskeln in Gramm		Absolute Mengen Phosphorfleischsäure (als Fleischsäure ber.) in Gramm		Phosphorfleischsäure in 1000 gr. Muskel in Gramm.		Bei der Muskelthätigkeit verbrauchte Mengen Phosphorfleischsäure	
	der ruhenden M.	der müden M.	der ruhenden M.	der müden M.	der ruhenden M.	der müden M.	für 1000 gr. Muskel in gr.	für 100 Theile Phosphorfleischsäure.
I.	645	640	1,6193	0,5996	2,40	0,93	1,47	61,3
II.	845	1010	1,1116	0,7344	1,31	0,73	0,58	44,3
III.	955	1210	0,5463	0,4697	0,57	0,39	0,18	31,6

Diese Versuche beweisen, dass Phosphorfleischsäure bei der Muskelthätigkeit verbraucht wird. Bedenkt man die oben mitgetheilten Erfahrungen über die Spaltung der Phosphorfleischsäure durch Hydrolyse, so gibt die Erkenntniss der Phosphorfleischsäure als Energiestoff den Schlüssel zur Er-

klärung mehrerer beim Stoffwechsel des Muskels bekannten Beobachtungen.

In erster Linie leuchtet ein, dass beim Verbrauch der Phosphorfleischsäure vom arbeitenden Muskel Kohlensäure durch Hydrolyse, ohne Verbrauch von Sauerstoff entstehen muss. Seit der Entdeckung Hermann's<sup>1)</sup>, dass bei der Muskelthätigkeit ohne Oxydation Kohlensäure entsteht, wissen wir, dass im Muskel Substanzen vorhanden sind, welche ohne Zufuhr von Sauerstoff bei ihrer Zersetzung Kohlensäure liefern. In der Phosphorfleischsäure ist dieser oder einer dieser Körper erkannt worden.

In einer grossen Reihe von Untersuchungen ist die Frage, ob bei der Muskelthätigkeit Phosphorsäure gebildet wird, behandelt worden. Neuerdings ist sie durch Klug und Olsavsky<sup>2)</sup> endgültig in bejahendem Sinne beantwortet worden. Weyl und Zeitler<sup>3)</sup> suchten nach der die Phosphorsäure liefernden Substanz und sprachen die Vermuthung aus, dass diese Nuclein sei, da das Lecithin nach ihren Befunden nur unbedeutend verbraucht wird. Jetzt ist als Quelle der Phosphorsäure die Phosphorfleischsäure anzusehen, die wegen ihrer nahen Verwandtschaft zu den Nucleinen als Nucleon bezeichnet wurde.

Ist die ausgesprochene Ansicht, dass Milchsäure bei der Hydrolyse aus Phosphorfleischsäure entsteht, richtig, so würde auch ein Beitrag zur Erklärung der Bildung dieser Säure bei der Muskelarbeit geliefert sein.

Ob nur die Kohlehydratgruppe oder auch die Stickstoffgruppe der Phosphorfleischsäure verbraucht wird, lasse ich dahingestellt. Vielleicht bleibt diese verschont und wird zum Wiederaufbau von Phosphorfleischsäure mit Hülfe der durch das Blut zugeführten Kohlehydrate verwendet.

Es liegt mir fern, die Phosphorfleischsäure als den Energiestoff der Muskeln anzusprechen. Denn die Annahme

<sup>1)</sup> L. Hermann: Untersuchungen über den Stoffwechsel der Muskeln. Berlin 1867.

<sup>2)</sup> Pflüger's Arch., Bd. 54, S. 21.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 6, S. 557.

verschiedener solcher Stoffe, welche schwerer und leichter hydrolysirbar bzw. oxydabel sind, scheint mir den Gesetzen der Muskelleistung entsprechender, als die Voraussetzung eines einzigen Nährstoffes zu sein.

Weil bei gleichen Reizen und zunehmender Belastung bis zu einem bestimmten Grade vom Muskel nicht nur mehr Arbeit geleistet, sondern auch mehr Wärme producirt wird, so muss bei stärkerer Belastung eine grössere Menge chemischer Spannkraft verbraucht werden als bei geringerer Belastung; die Auslösung dieser potentiellen Energie kann nicht durch den ursprünglichen Reiz in vollem Maasse geschehen, sondern muss durch die vermehrte Belastung bewirkt werden. Dass durch die Belastung die directe Wirkung des Reizes selbst vermehrt werde, ist nicht anzunehmen, weil der Schwellenwerth des Reizes unabhängig von der Belastung ist. Wohl aber kann man sich vorstellen, dass bei grösserer Belastung, bei welcher der Muskel in Folge der durch den Reiz ausgelösten ungenügenden Menge Energie zunächst keine Arbeit leisten kann, diese Energie so lange in Wärme umgesetzt wird, bis diese ausreicht, um den Zerfall eines anderen, schwieriger hydrolysirbaren und oxydirbaren Körpers durch den fortbestehenden Reiz zu ermöglichen und somit auch dessen chemische potentielle Energie auszulösen und in Arbeit und Wärme umzusetzen. Diese Vorstellung würde erfordern, dass zur Leistung ein und derselben Arbeit ein grösserer Stoffumsatz nothwendig wäre, wenn sie in weniger grösseren, als in mehreren kleineren Leistungen verrichtet wird. Dies ist ja thatsächlich der Fall.

Die Annahme verschiedener Energiestoffe der Muskeln bedeutet durchaus nicht, dass der Muskel die chemische potentielle Energie aus verschiedenen Atomgruppen in Arbeit umzusetzen hat. Es können aus den Energiestoffen immer dieselben Complexe verwendet werden, es kann somit das Arbeitsmaterial der Muskel ein einheitliches sein, auch wenn die Energiestoffe verschiedene sind.

Leipzig, 8. December 1895.