

Ueber die Abspaltung von Kohlensäure aus Phosphorfleischsäure durch Hydrolyse.

Von

Dr. Th. Richard Krüger.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Institutes der Universität Leipzig.)
(Der Redaction zugegangen am 31. März 1896.)

Vorstehende Versuche habe ich auf Anregung des Herrn Dr. M. Siegfried ausgeführt, um

1. die Menge der aus Phosphorfleischsäure durch Hydrolyse abspaltbaren Kohlensäure zu bestimmen;
2. zu entscheiden, ob es ausser der Phosphorfleischsäure noch andere Extractivstoffe der Muskeln gibt, welche Kohlensäure durch Hydrolyse bilden.

Die von M. Siegfried¹⁾ vor Kurzem mitgetheilten Thatsachen, dass Phosphorfleischsäure vom arbeitenden Muskel verbraucht wird und durch hydrolysirende Agentien Kohlensäure abspaltet, erklärt ganz oder zum Theil die Erfahrung, dass vom thätigen Muskel mehr Kohlensäure gebildet wird, als dem verbrauchten Sauerstoffe entspricht. Die Kenntniss der Menge der Kohlensäure, welche bei der Hydrolyse aus Phosphorfleischsäure entsteht, ist daher für die Beurtheilung der chemischen Vorgänge bei der Muskelthätigkeit von Interesse und zur Beantwortung der zweiten gestellten Frage nothwendig.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 376.

I. Quantitative Bestimmung der aus Phosphorfleischsäure durch Hydrolyse abspaltbaren Kohlensäure.

Der zur Kohlensäurebestimmung dienende Apparat war folgendermaassen zusammengesetzt:

Durch den dreifach durchbohrten Stopfen einer weithalsigen Flasche A führte einerseits eine kurz unter dem Stopfen endigende Glasröhre a, welche mit 2 Drechsel'schen Waschflaschen, von denen die eine mit Kalilauge, die andere mit Natronkalk beschickt war, verbunden war; in die zweite Bohrung des Stopfens war eine zweite kurz unter dem Stopfen abgeschnittene Glasröhre b, die mit einem Hahn versehen war, in die dritte Bohrung eine bis auf den Boden des Gefässes führende Glasröhre c eingesetzt. Glasröhren b und c mündeten in den Stopfen eines kleinen Hahnenrichters, dessen Röhre in den doppeltdurchbohrten Stopfen eines Erlenmeyer'schen Kolbens B eingesetzt war. Durch die andere Bohrung dieses Stopfens ging der Vorstoss eines Rückflusskühlers, welcher mit folgendem System von Absorptions-U-Röhren verbunden war: eine zur Zurückhaltung von Salzsäure mit Bimsteinstücken, die mit völlig entwässertem Kupfervitriol imprägnirt waren, gefüllte Röhre, ferner 2 mit granulirtem mit Kohlensäure gesättigtem Chlorcalcium gefüllten Röhren zum Trocknen des Gasstromes, und schliesslich die zum Auffangen und Wägen der Kohlensäure bestimmten Röhren, von denen zwei mit Natronkalk und eine mit Natronkalk und Chlorcalcium beschickt waren. Nach Aussen waren diese Absorptionsröhren durch zwei Control-Kugelhörnchen, in deren einer sich concentrirte Schwefelsäure, in deren anderer sich concentrirte Kalilauge befand, abgeschlossen. Sämmtliche Absorptionsgefässe waren nur durch ganz kurze Gummischläuche verbunden, wobei die Ansatzröhren an einander stiessen. Bei Ausführung der Versuche wurde Flasche B mit der gewogenen Substanz, Flasche A mit verdünnter (10proc.) Schwefelsäure beschickt. Hierauf wurde, ehe die zum Auffangen der Kohlensäure dienenden Absorptionsgefässe angesetzt waren, durch das System mit Hilfe eines Wassergebläses ein durch die Drechsel'schen

Waschflaschen von Kohlensäure befreiter Luftstrom geleitet, wobei der Hahn der Röhre b und der des Hahnenrichters geöffnet waren. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde wurden die gewogenen Absorptionsröhren eingesetzt und durch Schliessen des Hahnes der Röhre b Schwefelsäure in die Flasche B gedrückt. Darauf wurden die Hähne des Hahnenrichters und der Röhre b geschlossen und der Inhalt der Flasche B (Substanz und Schwefelsäure) zum Sieden erhitzt. Nach Beendigung des Siedens wurde unter Oeffnung der Hähne des Hahnenrichters und der Röhre b kohlensäurefreie Luft durchgeleitet und so die im Apparate noch befindliche Kohlensäure in die Absorptionsgefäße getrieben. Die Gewichtszunahme dieser ergab die abgespaltene Kohlensäure.

Versuch I. Phosphorfleischsäure.

Wegen der leichten Zersetzlichkeit der Phosphorfleischsäure ist es bekanntlich nicht möglich, diese aus dem Carniferrin völlig rein darzustellen. Stets werden durch Zersetzung des Carniferrins, z. B. mit Baryumhydrat, Producte erhalten, welche aus unzersetzter Phosphorfleischsäure mit deren Zersetzungsproducten bestehen, deren Trennung bis jetzt nicht gelungen ist. Wenn desshalb von vornherein davon abgesehen werden musste, die durch Hydrolyse abspaltbare Kohlensäure an der Phosphorfleischsäure selbst zu bestimmen, so wurde doch ein quantitativer Versuch mit einem Präparate, das von M. Siegfried¹⁾ dargestellt und u. A. auch zum qualitativen Nachweis der abspaltbaren Kohlensäure verwendet war, angestellt, um eine Vorstellung über die Menge der in solchen Präparaten vorhandenen unzersetzten Phosphorfleischsäure, nachdem auf anderem Wege die Quantität der aus dieser abspaltbaren Kohlensäure festgestellt sein würde, zu gewinnen.

Bei diesen und den folgenden Versuchen wurde die Substanz lufttrocken verwendet und der Feuchtigkeitsgehalt dieser durch Parallelversuche, bei denen die Substanz bei 105° bis zum constanten Gewicht gebracht wurde, bestimmt. Die an-

¹⁾ L. c. S. 365.

geführten Substanzmengen sind die aus diesen Trockenbestimmungen berechneten Mengen.

- a) 1,3163 gr. Substanz gaben 0,0283 gr. CO_2 = 2,15 %.
 b) 1,9470 » » » 0,0457 » » = 2,34 »

Versuch II. Carniferrin aus Liebig's Fleischextract.
 Präparat I.

- a) 3,9394 gr. Substanz gaben 0,1080 gr. CO_2 = 2,74 %.
 b) 3,9890 » » » 0,0902 » » = 2,26 »

Versuch III. Carniferrin aus Liebig's Fleischextract.
 Präparat II.

- a) 1,9566 gr. Substanz gaben 0,0385 gr. CO_2 = 1,98 %.
 b) 1,9933 » » » 0,0423 » » = 2,12 »

Versuch IV. Carniferrin aus Liebig's Fleischextract.
 Präparat III.

1,9318 gr. Substanz gaben 0,0418 gr. CO_2 = 2,16 %.

Zur Beurtheilung der Resultate, deren Uebereinstimmung für die Zuverlässigkeit der angewandten Methode spricht, empfiehlt es sich, die erhaltenen Werthe in Vergleich mit dem Stickstoffgehalt des Carniferrins zu setzen und somit das Verhältniss des Stickstoffes der Phosphorfleischsäure zu der abspaltbaren Kohlensäure zu berechnen.

Bei der Bestimmung nach Kjeldahl lieferten die drei untersuchten Präparate verschiedener Darstellungen im Mittel 5,5% Stickstoff, wobei die Werthe der einzelnen Analysen nur in der zweiten Decimale der Procente variirten. Aus den 5 Kohlensäurebestimmungen der Versuche II, III, IV ergibt sich im Mittel für die aus dem Carniferrin abspaltbare Kohlensäuremenge: 2,25%. Somit kommen auf 1 gr. Carniferrinstickstoff 0,4091 gr. abspaltbare Kohlensäure.

Da die in starksaurer Lösung dargestellten Carniferrinpräparate frei von Carbonat waren, wovon ich mich durch besondere Versuche überzeugte, kommen auch auf 1 gr. Phosphorfleischsäurestickstoff 0,4091 gr. abspaltbare Kohlensäure.

Da das Carniferrin 2% Phosphor enthält, entspricht ziemlich genau 1 Atom Phosphor 1 Molekül abspaltbarer

Kohlensäure, so dass es wahrscheinlich ist, dass 1 Molekül Phosphorfleischsäure 1 Molekül Kohlensäure bei der Hydrolyse abspaltet.

II. Finden sich in den Muskelextracten ausser der Phosphorfleischsäure noch andere Substanzen, die bei der Hydrolyse Kohlensäure abspalten?

Zur Beantwortung dieser Frage sollte in Muskelextracten einmal die Phosphorfleischsäure nach der von Balke und Ide¹⁾ mitgetheilten Methode quantitativ bestimmt und das andere Mal die aus der Extractlösung abspaltbare Kohlensäure nach dem oben geschilderten Verfahren ermittelt werden. Entsprechend der Menge der gegenwärtigen Phosphorfleischsäure die gefundene, Kohlensäuremenge, so müsste auf das Fehlen wesentlicher Mengen anderer, Kohlensäure durch Hydrolyse liefernder, Substanzen geschlossen werden. Liess sich aus dem Extract mehr Kohlensäure gewinnen, als sich aus der vorhandenen Phosphorfleischsäure erklären liess, so ergab sich, dass im Muskel noch andere Extractivstoffe vorhanden sind, welche Kohlensäure ohne Sauerstoffverbrauch liefern.

Auch hier wurde wegen der grossen Gleichmässigkeit des Productes Liebig's Fleischextract verwendet.

A. Bestimmung der Phosphorfleischsäure

I. 15,7187 gr. Extract gaben 3,5854 gr. Carniferrin.

a) 0,3930 gr. Substanz erf. 11,7 ccm. H_2SO_4 $\frac{1}{10}$ N = 4,17 % N.

b) 0,3514 » » » 11,1 » » » = 4,42 » »

Mittel: 4,30 % N.

100gr. Extract enthielten also 0,9808 gr. Phosphorfleischsäure-Stickstoff.

II. 16,1526 gr. Extract gaben 3,3727 gr. Carniferrin.

a) 0,4222 gr. Substanz erf. 13,9 ccm. H_2SO_4 $\frac{1}{10}$ N = 4,60 % N.

b) 0,3420 » » » 12,05 » » » = 4,93 » »

Mittel: 4,77 % N.

100gr. Extract enthielten also 0,9922 gr. Phosphorfleischsäure-Stickstoff.

Beide Bestimmungen ergeben im Mittel: 0,9865 gr. Phosphorfleischsäure-Stickstoff.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 380.

B. Bestimmung der Kohlensäure.

- I. 30,6410 gr. Extract gaben 0,0612 gr. CO_2 = 0,20 %.
- II. 37,5774 » » » 0,0688 » » = 0,18 »

Den 0,9865 gr. Phosphorfleischsäure-Stickstoff in 100 gr. Extract würden nach den oben mitgetheilten Bestimmungen 0,4036 gr. CO_2 entsprechen. Diese Versuche ergaben also überraschender Weise ein Resultat, das keiner der geäußerten Voraussetzungen entsprach. Es war aus dem Extract durch Hydrolyse nicht ebensoviel und nicht mehr Kohlensäure abgespalten als der Phosphorfleischsäure entspricht, sondern erheblich weniger, nur knapp die Hälfte.

Dieses Resultat ist nur dadurch zu erklären, dass man annimmt, dass in den Muskelextracten die Phosphorfleischsäure nur zum Theil vorgebildet vorhanden ist und dass der andere Theil erst durch die Behandlung mit Eisenchlorid entsteht. Es wäre zu denken, dass eine Aldehydgruppe $\text{C} \begin{array}{l} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$ in eine Carboxylgruppe COOH durch Oxydation mittelst Eisenchlorides übergeführt würde. Im Muskel würde sich demnach sowohl fertig gebildete Phosphorfleischsäure vorfinden, welche bei der Hydrolyse Kohlensäure bildet, als auch die hypothetische Aldehydverbindung, eine reducirende Substanz, welche erst durch Oxydation in die Kohlensäure abspaltende Phosphorfleischsäure übergeht.

Hiermit wäre die Voraussetzung, welche die Veranlassung zur Auffindung der Phosphorfleischsäure war, erfüllt. M. Siegried schreibt in seiner ersten diesbezüglichen Mittheilung Folgendes: «Nach weiteren vergeblichen Versuchen stand ich davon ab, die reducirende Substanz selbst zu isoliren und suchte ein Oxydationsproduct derselben zu gewinnen. Verdankt die Substanz ihre reducirende Eigenschaft dem Vorhandensein einer Aldehydgruppe, so war zu erwarten, dass bei gemässiger Oxydation eine Säure entstand».

Was liegt näher, als die Annahme, dass im ruhenden Muskel, wo mehr Sauerstoff verbraucht als in Kohlensäure

¹⁾ Ber. der math.-phys. Cl. der Königl. Sächs. Ges. d. Wiss. Leipzig 1893, S. 486.

ausgeschieden wird, diese reducirende Substanz allmählig zur Phosphorfleischsäure oxydirt wird, und dass, während diese unter Abspaltung von Kohlensäure vom thätigen Muskel verbraucht wird, jene neu gebildet oder zugeführt wird?

Der Befund, dass im Muskelextract nur die Hälfte der durch Eisenchlorid quantitativ bestimmbar Phosphorfleischsäure vorgebildet ist, ermunterte zu dem Versuche, die Kohlensäure, welche aus Muskelextract durch verdünnte Schwefelsäure bei Gegenwart von Eisenchlorid abspaltbar ist, zu bestimmen. Es war zu erwarten, dass in diesem Falle entweder ebensoviel oder mehr Kohlensäure gefunden würde, als der bestimmbar Menge Phosphorfleischsäure entspricht, nachdem, ob ausser der Phosphorfleischsäure keine oder doch andere Substanzen, welche Kohlensäure bei der Hydrolyse liefern, in den Muskelextracten vorkommen.

III. 29,9789 gr. Extract lieferten beim Kochen mit Eisenchlorid und verdünnter Schwefelsäure 0,1106 gr. $\text{CO}_2 = 0,37\%$

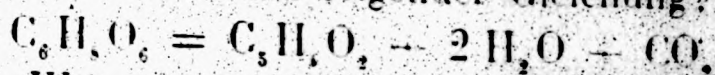
IV. Bei diesem Versuche wurde die Extractlösung erst einige Minuten mit Eisenchlorid und dann mit verdünnter Schwefelsäure im Apparate erhitzt, um die Möglichkeit auszuschliessen, dass die Schwefelsäure theilweise die reducirende Substanz zerstörte, ehe diese zur Phosphorfleischsäure übergeführt wäre.

34,2982 gr. Extract gaben 0,1579 gr. $\text{CO}_2 = 0,46\%$

Aus der aus demselben Extracte erhaltenen Menge Carniferrin berechnet sich $\text{CO}_2 = 0,404\%$

Hieraus ist zu schliessen, dass im Muskelextracte ausser Phosphorfleischsäure keine wesentlichen Mengen von Substanzen vorkommen, welche bei der Hydrolyse bez. gleichzeitiger Oxydation mittelst Eisenchlorides Kohlensäure liefern. Man hat also in der Phosphorfleischsäure diejenige Substanz zu sehen, welche bei der Muskelthätigkeit Kohlensäure bildet, ohne Sauerstoff zu verbrauchen.

Nachdem vor Kurzem Mann¹⁾ und Tollens²⁾ gezeigt haben, dass Glykuronsäure, bezw. dessen Anhydrid beim Kochen mit Salzsäure nach folgender Gleichung:



Furfurol, Wasser und Kohlensäure zerfällt, liegt die Vermuthung nahe, dass die Kohlenhydratgruppe der Phosphor-

¹⁾ Liebig's Annalen der Chemie, Bd. 290, S. 157.

fleischsäure zur Glykuronsäure in enger Beziehung steht. Auch diese liefert beim Kochen mit Säuren Furfurol und Kohlensäure. Ich habe mich nochmals durch einen Versuch überzeugt, dass die zur Bestimmung der Kohlensäure verwandten Mengen Carniferrin bei der Destillation mit verdünnter Schwefelsäure Furfurol lieferten, das durch die Reactionen mit Cholalsäure, α -Naphthol und Phenylhydrazin nachweisbar ist.

Leipzig, 30. März 1896.