

Über Methoden zur Begutachtung des Fleischextraktes.

Von

M. Siegfried.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Juni 1903.)

Vor kurzem¹⁾ haben Fr. Kutscher und H. Steudel angegeben,²⁾ daß Liebig's Fleischextrakt nach ihren Befunden wesentliche Mengen Bernsteinsäure enthalte. Verfasser haben hierbei zwei Verfahren angewendet, welche entgegen der Annahme der Verfasser zu unrichtigen Resultaten führen.

Verfahren I. Kutscher und Steudel extrahieren die Lösung von 50 g Fleischextrakt in ca. 500 ccm Wasser im bekannten Schwarzschen Apparat nach Zusatz von 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure, zuweilen 14 Tage 4—6 Stunden täglich. Aus dem Ätherextrakt gewinnen sie über das Silbersalz Bernsteinsäure 0,325—0,882 g; Kutscher und Steudel geben nicht an, wieviel Versuche sie gemacht haben, noch ob sie Parallelbestimmungen ausgeführt haben, noch die Resultate einzelner Versuche.

Bei dieser Behandlung der Fleischextraktlösung mit soviel überschüssiger Schwefelsäure findet eine Zersetzung von Bestandteilen des Fleischextraktes, vor allem des Nucleons, der Phosphorfleischsäure, statt.

Setzt man zu der Lösung von 50 g Liebig-Fleischextrakt — zu diesem und den folgenden Versuchen habe ich frisch von dem hiesigen Engros-Geschäft Theuerkauf und Scheibner bezogenes Extrakt in mit Rubner und Voits Namen versehener Büchse verwendet — aus der Bürette eine Lösung, die durch Vermischen von 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure mit

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 101.

²⁾ Mitgeteilt ist die Arbeit nur von Kutscher.

Wasser zu 250 ccm hergestellt ist, so färbt nach Zusatz von 75 ccm die Lösung Congopapier deutlich blau, also schon nach Zusatz von weniger als $\frac{1}{3}$ der von Kutscher und Steudel verwendeten Menge.

Versuch I.

50 g Fleischextrakt wurden in 500 ccm Wasser gelöst, dazu 80 ccm von einer wässerigen Lösung von 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure zu 250 ccm gegeben und im Schwarzschen Apparat während 6 Tagen 59 Stunden mit Äther extrahiert. Da hierbei etwas von der Fleischextraktlösung in den Ätherkolben übergeht, wurde die ätherische Lösung hiervon abgegossen, die übergegangene geringe Menge der Fleischextraktlösung wiederholt mit großen Mengen Äther ausgeschüttelt, die vereinigten ätherischen Lösungen abdestilliert. Der Rückstand wurde nach den Angaben von Kutscher und Steudel weiter verarbeitet. Auf Zusatz der Silbernitratlösung entstand nur ein ganz geringer Niederschlag, der sich rasch schwärzte. Derselbe bildete, auf kleinem Filter abfiltriert, nur einen ganz schwachen, das Filter schwarz färbenden Überzug. Die ätherischen Extrakte enthielten also höchstens ganz geringe Mengen Bernsteinsäure.

Hierauf wurde dieselbe Fleischextraktlösung weitere 12 Tage im Schwarzschen Apparate unter Äther gelassen und hierbei 60 Stunden der Äther im Sieden gehalten. Die ätherischen Extrakte wurden, wie oben angegeben, gemacht und weiter verarbeitet. Es wurde so eine geringe, sich wiederum rasch schwärzende Silberfällung erhalten, die nach Zersetzung mit Salzsäure 0,0122 g Rückstand gab.

Hierauf wurden zu derselben Fleischextraktlösung 13 ccm konzentrierte Schwefelsäure gegeben und die Mischung 5 Tage im Schwarzschen Apparate gelassen, wobei 36 Stunden extrahiert wurde. Aus dem aus dem Ätherrückstand gewonnenen Silbersalze wurden 0,1018 g Rückstand erhalten.

Versuch II.

Dieser Versuch wurde genau wie Versuch I und zwar gleichzeitig parallel ausgeführt. Es wurde dasselbe Extrakt wie in Versuch I angewendet. Zum Unterschiede von Versuch I

wurde von Anfang an ein größerer Überschuß von Schwefelsäure zugesetzt, nämlich 90 ccm anstatt 80 ccm im ersten Versuche der auf 250 ccm verdünnten 20 ccm konzentrierten Schwefelsäure. Die erste Extraktion lieferte hier eine Silberfällung, die ebenfalls sich rasch schwärzte und nach Zersetzung mit Salzsäure 0,1692 g Rückstand gab. Der Rückstand aus dem Silbersalze der II. Extraktion wog 0,0465 g, der aus der dritten 0,0341 g.

Ich habe hier die Silberfällungen angewandt, weil sie Kutscher und Steudel benutzt haben; ich halte aber, schon weil das bernsteinsaure Silber nicht unlöslich in Wasser ist, die Abscheidung der Bernsteinsäure als Silbersalz für keinen vorteilhaften Ersatz für die übliche Fällung der Bernsteinsäure als Baryumsalz.

Diese Versuche zeigen, daß durch Einwirkung von Schwefelsäure Bernsteinsäure aus Bestandteilen des Fleischextraktes abgespalten wird.

Wenn es auch nicht feststeht, daß das Muskelnucleon, die Phosphorfleischsäure, der einzige Bestandteil des Fleischextraktes ist, welcher bei der Hydrolyse Bernsteinsäure liefert, so ist es doch, wenn nicht die einzige, sicher eine wesentliche Quelle der durch Hydrolyse aus Fleischextrakt gewinnbaren Bernsteinsäure. Deshalb mußte sich die Zersetzung mit Schwefelsäure, wie sie Kutscher und Steudel unwissentlich ausgeführt haben, in scharfer Weise durch Verminderung des organischen Phosphors durch Einwirkung von Schwefelsäure der von Kutscher und Steudel angewendeten Konzentration erkennen lassen. Die zu dem Zwecke angeführten Versuche bestätigten völlig diese Annahme.

Versuch III.

40 g desselben, zu den Versuchen I und II verwendeten Extraktes wurden zu 400 ccm in Wasser gelöst, die Phosphate durch Baryt bei geringem Überschusse des letzteren gefällt, das Filtrat — das Filter wurde nicht quantitativ ausgewaschen — und Waschwasser genau mit Schwefelsäure neutralisiert, das Filtrat vom Baryumsulfat bei niederer Wasserbadtemperatur etwas eingengt und zu 400 ccm aufgefüllt. Davon wurden

1. je 100 ccm mit Ätznatron und Salpeter verschmolzen und der Phosphor der Schmelze mit molybdänsaurem Ammon und dann Mangnesiamischung bestimmt.

2. je 100 ccm mit je genau 4 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und mit Äther bis zur Sättigung geschüttelt. Nachdem diese Mischungen 12 Tage bei Zimmertemperatur gestanden hatten, wurden sie mit Baryt eben alkalisch gemacht und jede auf 400 ccm mit Wasser aufgefüllt. Nach Absetzen des Niederschlages wurden je 200 ccm der klaren Flüssigkeiten in Silberschalen eingedampft, mit Ätznatron und Salpeter verschmolzen und der Phosphor wie oben bestimmt.

1. Die Bestimmungen des organischen Phosphors vor der Einwirkung der Schwefelsäure ergaben:

$$a) 0,0749 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0209 \text{ g P}$$

$$b) 0,0721 \text{ » » } = 0,0201 \text{ » »}$$

2. Die Bestimmungen des nach der Einwirkung der Schwefelsäure gebliebenen organischen Phosphors ergaben:

$$c) 0,0049 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0014 \text{ g P}$$

$$d) 0,0030 \text{ » » } = 0,0008 \text{ » »}$$

Diese letzteren Werte sind, da nur die Hälfte der in 1 verwendeten Mengen Extraktes verschmolzen wurden, mit 2 zu multiplizieren = 0,0028 und 0,0016 g P. Die Berücksichtigung des Volumens des Barytniederschlages würde diese Werte noch etwas verringern.

Aus Versuch III geht hervor, daß durch die von Kutscher und Steudel angewendete Konzentration der Schwefelsäure während der Extraktion mit Äther fast der gesamte, durch Baryt nicht fällbare organische Phosphor abgespalten wird, daß also das Bernsteinsäure bei der Hydrolyse liefernde Nucleon ganz oder fast ganz zersetzt wird.

Kutscher und Steudel haben geglaubt, dem Einwand, daß durch die Einwirkung der Schwefelsäure die von ihnen extrahierte, irrtümlich als präformierte angesehene Bernsteinsäure entstanden sein könnte, durch ein II. Verfahren begegnen zu können.

Dieses II. Verfahren ist ebenfalls unrichtig, denn es beruht auf zwei falschen Voraussetzungen.

Bei diesem Verfahren wird mit Ammonsulfat ausgesalzen und das Filtrat wie beim I. Verfahren mit Schwefelsäure versetzt und extrahiert. Kutscher und Steudel glauben, so die Phosphorfleischsäure und somit die nach der Ansicht der Verfasser vermeintliche Quelle der Bernsteinsäure entfernt zu haben.

Die beiden falschen Voraussetzungen sind folgende:

1. Daß außer dem Nucleon keine, Bernsteinsäure bei der Hydrolyse liefernde Substanzen vorkommen oder wenigstens nicht solche, die durch Ammonsulfat nicht gefällt werden.

Dies ist vorläufig nicht bewiesen, es ist daher mit der Existenz solcher Substanzen zu rechnen.

2. Daß das Nucleon, die Phosphorfleischsäure, durch Ammonsulfat als solches ausgesalzen wird.

Dies ist nicht der Fall.¹⁾ Schon durch R. Krüger²⁾ ist es wahrscheinlich gemacht worden, daß das Muskelnucleon durch Aussalzen mit Ammonsulfat zersetzt wird. Wie vollständig diese Zersetzung ist, zeigt

Versuch IV.

50 g Liebigs Extrakt, dasselbe, welches in Versuch I—III verwendet wurde, wurde in 500 ccm Wasser gelöst, mit sehr geringem Überschuß von Barythydrat von Phosphaten befreit, durch Schwefelsäure barytfrei gemacht, das Filtrat nach Neu-

¹⁾ In einer Anmerkung, in der es Kutscher unternimmt, die Phosphorfleischsäure «endgiltig erledigen» zu wollen, macht Kutscher die Angabe, er habe aus den durch Ammonsulfat ausgesalzene Massen Carniferrin dargestellt, welches «völlig identisch» mit dem echten Carniferrin Siegfrieds gewesen wäre, nur wäre bei seiner Darstellung die Beimengung der im Fleischextrakt präformiert vorhandenen Milchsäure und Bernsteinsäure vermieden. Kutscher gibt nicht an, auf welche Weise er sich die Überzeugung, der von ihm erhaltene Niederschlag sei «völlig identisch» mit meinem Carniferrin gewesen, verschafft hat. Solche nicht näher begründete Angaben wie «völlig identisch» sind wertlos. Aus dem oben Mitgeteilten geht hervor, daß Kutscher sich geirrt hat.

²⁾ Th. R. Krüger, Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 530.

tralisation mit Ammoniak mit Ammonsulfat gesättigt, der Niederschlag abfiltriert, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, möglichst quantitativ vom Filter genommen, in Wasser gelöst, durch Sättigen mit Ammonsulfat wieder ausgeschieden, filtriert, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, möglichst quantitativ vom Filter genommen und der ganze Niederschlag mit Ätznatron und Salpeter verschmolzen. Nach Lösen der Schmelze in Wasser und Salpetersäure erzeugte molybdänsaures Ammon keine Fällung; nach 2 Tagen selbst befand sich am Boden des Gefäßes eine ganz geringe gelbe Ausscheidung. Nach Filtrieren durch ein kleines Filter, Auswaschen, Abspülen des Gefäßes und Auswaschen des Filterchens mit Ammoniak, Abstumpfen mit Salzsäure und Zusatz von Magnesiamischung entstand keine Ausscheidung. Erst andern Tags hatten sich vereinzelt Kryställchen am Boden der Flasche ausgeschieden.

Der durch Ammonsulfat ausgesalzene Niederschlag enthielt also nur Spuren von Phosphor. Da, wie ich zuerst¹⁾ nachgewiesen habe, die Biuretreaktion gebende Spaltungsprodukt des Muskelnucleons durch Ammonsulfat ausgesalzen wird, während erst die sekundär aus diesem durch Hydrolyse entstehende Fleischsäure in gesättigter Ammonsulfatlösung löslich ist, ist durch Versuch IV die Zersetzung des Muskelnucleons durch Aussalzen mit Ammonsulfat endgültig bewiesen.

Wenn also nur das die Biuretreaktion gebende Spaltungsprodukt durch Ammonsulfat ausgesalzen wird, so muß das Verfahren II von Kutscher und Steudel auch aus dem Filtrate des Ammonsulfatniederschlags Bernsteinsäure liefern, ohne daß diese als präformiert anzusehen ist.

Weder das Verfahren I noch das Verfahren II von Kutscher und Steudel gibt also Aufschluß über die Gegenwart präformierter Bernsteinsäure im Fleischextrakt.

Aus dem hier Mitgeteilten geht zugleich hervor, daß bis jetzt kein Grund vorliegt, welcher die Annahme, daß Bernstein-

¹⁾ M. Siegfried, Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 367.

säure ein Spaltungsprodukt des Muskelnucleons sei, ungerechtfertigt erscheinen läßt.¹⁾

Ich bemerke ausdrücklich, daß ich die Frage, ob es Fleischextrakte gibt²⁾, welche präformierte Bernsteinsäure enthalten, offen lasse. Soviel ist jedoch erwiesen, daß die Versuche von Kutscher und Steudel nicht ergeben, daß die von ihnen untersuchten Fleischextrakte der Liebig-Extrakt-Kompagnie, welche unter der Kontrolle von Voit und Rubner stehen, Bernsteinsäure enthalten haben, die nach unsern heutigen Kenntnissen als Zersetzungsprodukt von Extraktivstoffen der Muskeln anzusehen ist.

¹⁾ K. Mays (Zeitschr. f. Biologie, Bd. 34, S. 268) hat in Bestätigung meiner früheren Befunde (Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 260) mitgeteilt, daß das zunächst durch Baryhydrat aus Carniferrin entstehende, die Biuretreaktion gebende Produkt durch Ammonsulfat fällbar ist; im Gegensatz zu mir hat er nicht das sekundäre Produkt, die durch Ammonsulfat nicht aussalzbare Fleischsäure, erhalten. Jetzt, nachdem sich die Eisenmethode zur Reindarstellung der Peptone als sicher bewährt hat, habe ich Versuche begonnen, welche prüfen sollen, ob die Fleischsäure völlig identisch mit dem nunmehr scharf charakterisierten Fibrin-Trypsinpepton α ist oder sich vielleicht durch das optische Drehungsvermögen von diesem unterscheidet. Daß sie gleiches Äquivalentgewicht und Zusammensetzung besitzt, habe ich früher bewiesen. Vorläufig kann ich nur soviel mitteilen, daß ich im Gegensatz zu Mays durch Spaltung des Carniferrins mit Baryhydrat bei 50° wieder ein in Ammonsulfat lösliches, die Biuretreaktion gebendes, ausgesprochen saures Produkt erhalten habe, das nach der Eisenmethode aus dem zweiten Eisenniederschlage dargestellt wurde und dementsprechend völlig frei von durch Ammonsulfat fällbarer Substanz war.

²⁾ Kutscher und Steudel besprechen (S. 104) Versuche von Macleod, die derselbe unter meiner Leitung mit Fleischextrakt ausgeführt haben soll, welche überhaupt niemals gemacht worden sind!! In der von Kutscher und Steudel citierten Arbeit Macleods (Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 535) «zur Kenntnis des Phosphors im Muskel», welche unter meiner Leitung ausgeführt ist, kommt Fleischextrakt überhaupt nicht vor!
