

Über die Chemie des Lactacidogens.

I. Mitteilung.

Isolierungsversuche.

Von

Gustav Embden und Fritz Laquer.

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der Universität Frankfurt.)
(Der Redaktion zugegangen am 22. September 1914.)

In einer voranstehenden Arbeit konnten wir zeigen, daß Preßsaft aus Skelettmuskeln vom Hunde bei kurzdauerndem Stehen neben dem bereits früher beschriebenen Auftreten von Milchsäure eine reichliche Bildung von anorganischer Phosphorsäure aufweist.

Unter gewissen Versuchsbedingungen war die Menge der gebildeten Phosphorsäure, wenigstens in der überwiegenden Mehrzahl der Versuche, der gebildeten Milchsäure praktisch äquimolekular. Wir schlossen daraus, daß das Lactacidogen, zu dessen Annahme bereits frühere Versuche von Embden, Kalberlah und Engel¹⁾ geführt hatten, eine organische Phosphorsäureverbindung ist, die — anscheinend auf fermentativem Wege — unter Bildung von Milchsäure und Phosphorsäure gespalten werden kann.

Wir bemühten uns auch bereits in der eingangs erwähnten Arbeit, bis zu einem gewissen Grade Aufschluß über die chemische Natur des Lactacidogens zu gewinnen.

Zu diesem Zwecke setzten wir zunächst verschiedene als Bestandteile des tierischen Organismus bekannte organische Phosphorsäureverbindungen dem Muskelpreßsaft zu, in der Hoffnung, durch derartige Zusätze eine Vermehrung der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Preßsaft zu erzielen.

¹⁾ Embden, Kalberlah und Engel, Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 45, 1912.

Aber ebensowenig, wie es Embden, Kalberlah und Engel sowie Kura Kondo¹⁾ gelungen war, durch Zusatz von Traubenzucker, Glykogen, Inosit oder Alanin eine vermehrte Milchsäurebildung zu erzielen, führten die Versuche von Embden, Griesbach und Schmitz unter Zusatz verschiedener Nucleinsäuren (Tymonucleinsäure, Hefenucleinsäure, Inosinsäure) von Thyminsäure und von Phytin zu einem positiven Ergebnis. Weder wurde aus einer der zugesetzten Substanzen unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen Milchsäure, noch Phosphorsäure gebildet. Ebensowenig handelte es sich offenbar um eine Substanz phosphatidartiger Natur.

Dagegen gelang es uns, durch den Zusatz einer anderen Substanz ohne weiteres den Umfang der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung zu steigern. Das Vorkommen dieser Substanz, der Hexosediphosphorsäure, ist zwar für den Tierkörper nicht bekannt, doch kommt ihr offenbar als intermediärem Produkt bei der alkoholischen Gärung der Hefe eine hohe Bedeutung zu. Als einziger von allen bisher untersuchten Körpern vermag diese, bei der Hefegärung gebildete Hexosephosphorsäure die Milchsäurebildung und auch die Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft zu steigern.

Diese Tatsache führte uns zu der Vermutung, daß das Lactacidogen eine der Hexosephosphorsäure verwandte Substanz sei, und daß dem Lactacidogen für den Kohlenhydratabbau im quergestreiften Muskel eine ähnliche Bedeutung zufiele, wie der Hexosephosphorsäure bei der Hefegärung. Wir stellten uns hierbei vor, daß für die Spaltung der Hexose unter Auftreten von Milchsäure ihre vorherige Bindung an Phosphorsäure oder einen organischen Phosphorsäurerest ebenso sehr Vorbedingung sei, wie es allem Anschein nach die Bildung von Hexosephosphorsäure aus Hexose und Phosphorsäure für die Alkohol- und Kohlensäurebildung durch Hefe ist.

Wir gaben ferner der Vermutung Ausdruck, daß das Lactacidogen als Überträgersubstanz anzusehen sei, in dem Sinne, daß beim intramuskulären Kohlenhydratabbau immer

¹⁾ Kura Kondo, Biochem. Zeitschr., Bd. 45, S. 63, 1912.

neues Kohlenhydrat sich mit der gleichen Phosphorsäure¹⁾ paart, um erst durch diese Paarung dem fermentativen Abbau zu Milchsäure zugänglich zu werden.

In weiteren Untersuchungen von R. Meyer und M. Cohn konnte alsdann gezeigt werden, daß Preßsaft aus der glatten Muskulatur des Uterus sich ganz wesentlich von dem aus quergestreiften Muskeln unterscheidet.

Hier findet im Gegensatz zu der reichlichen Milchsäure- und Phosphorsäurebildung in dem aus quergestreiften Muskeln gewonnenen Preßsaft eine kaum merkliche Bildung von Milchsäure und nur eine ziemlich geringfügige Phosphorsäurebildung statt.

Offenbar handelt es sich hierbei nicht um einen Mangel an den entsprechenden Fermenten; vielmehr konnte Hagemann zeigen, daß Uteruspreßsaft mindestens ebenso stark wie Preßsaft aus Skelettmuskeln zugesetztes Hexosephosphat zu Milchsäure und Phosphorsäure abzubauen vermag.

Wenn aus den Versuchen von Meyer und Cohn hervorgeht, daß keineswegs in jeder Muskulatur die von uns als Lactacidogen bezeichnete Substanz abgelagert ist, so zeigten die in einer voranstehenden Arbeit niedergelegten Untersuchungen von F. Laquer, daß unter geeigneten Versuchsbedingungen auch in quergestreiften Muskeln des Frosches neben der seit langem bekannten und namentlich durch Fletcher und Hopkins studierten Milchsäurebildung eine solche von Phosphorsäure auftritt.

Das Ausbleiben der Phosphorsäurebildung bei der einfachen Tätigkeit isolierter Froschmuskeln, die bekanntlich mit einer ganz wesentlichen Milchsäurebildung verknüpft ist, erklärt sich vielleicht so, daß unter diesen physiologischen oder nahezu physiologischen Bedingungen die assimilatorische Anlagerung von Kohlenhydrat an Phosphorsäure der dissimilatorischen Spaltung von Lactacidogen zu Milchsäure und Phosphorsäure die Wage hält. Damit stimmt aufs Beste überein, daß die Wärmestarre, die mit einer wesentlichen Störung der normalen morphologischen und chemischen Struktur verbunden

¹⁾ resp. dem gleichen organischen Phosphorsäurerest.

ist, so gut wie regelmäßig auch zu Phosphorsäurebildung führt, und daß diese Phosphorsäurebildung ganz wesentlich gesteigert wird, wenn man die mit der Wärmestarre verbundene Struktur-schädigung durch vorherige Zerkleinerung der Muskeln vermehrt. Ja, es gewann den Anschein, als ob schon die Muskelzerkleinerung an sich das Auftreten gewisser Phosphorsäuremengen herbeiführt.

Jedenfalls stehen auch die von Laquer am Frosche gewonnenen Untersuchungsergebnisse mit der Annahme im Einklang, daß das Lactacidogen eine der Hexosephosphorsäure ähnliche organische Phosphorsäureverbindung ist.

So einleuchtend die in den bisherigen Untersuchungen mitgeteilten Tatsachen es erscheinen lassen, daß das Lactacidogen ein der Hexosephosphorsäure nahestehender Körper ist, und daß der Kohlenhydratabbau im Muskel ganz oder teilweise unter intermediärer Bindung an Phosphorsäure erfolgt, so sind die bisher hierfür beigebrachten Tatsachen nicht unbedingt beweisend, oder die Beweisführung ist doch eine mehr indirekte.

Der eindeutige und direkte Beweis für das Vorhandensein von Lactacidogen in der Muskulatur kann natürlich nur durch seine Isolierung aus dem Muskel erbracht werden.

Die Isolierung des Lactacidogens ist das Ziel der vorliegenden Untersuchung. Dieses Ziel ist zwar bisher nicht im strengen Sinne des Wortes erreicht, d. h. es ist einstweilen nicht gelungen, das Lactacidogen in analysenreiner Form zu gewinnen.

Wenn wir dennoch bereits jetzt unsere Versuche veröffentlichen, so geschieht es, weil wir glauben, daß sie bereits im jetzigen Stadium eine sehr gewichtige Stütze für die von uns geäußerten Anschauungen über die Natur des Lactacidogens bilden.

Gleich hier möchten wir die Fachgenossen bitten, uns die Fortführung dieser Isolierungsversuche noch eine gewisse Zeit zu überlassen.

Von vorneherein durften wir es als sicher annehmen, daß das Lactacidogen wenigstens zum Teil in den Preßsaft

übergeht; denn unsere Versuchsergebnisse über Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Muskel waren ja zum größten Teil an Preßsäften gewonnen worden.

Wir suchten nun zunächst festzustellen, ob das Lactacidogen an Eiweiß gebunden ist und dementsprechend bei der Fällung nach Schenck in den Eiweißniederschlag übergeht. Ohne weiteres ließ sich zeigen, daß dies nicht der Fall ist. Der gesamte Phosphor des Preßsaftes geht nämlich bei der Eiweißfällung mit Salzsäure und Sublimat nach Schenck in das Filtrat über, wie folgende Versuche zeigen:

Versuch 1.

Es wurden bei der Gesamtphosphorsäurebestimmung in 100 ccm Vollpreßsaft 0,539 bzw. 0,535 g H_3PO_4 ¹⁾ im Mittel 0,537 g gefunden. Für die 100 ccm Preßsaft entsprechende Filtratmenge (300 ccm) wurde sehr annähernd der gleiche Wert ermittelt (0,533 bzw. 0,542, im Mittel 0,538 g).

Hiernach ist der Phosphorgehalt in 100 ccm Preßsaft demjenigen in der 100 ccm entsprechenden Filtratmenge der Schenckfällung gleich, an Eiweiß gebundener Phosphor findet sich also in diesem Preßsaft überhaupt nicht in bestimmbarer Menge.

Dieser Befund wurde in einem weiteren Versuch bestätigt.

Versuch 2.

Es betrug die Menge der Gesamtphosphorsäure eines Hundemuskelpreßsaftes 0,591% bzw. 0,577% im Mittel 0,584%. Gesamtphosphor im dreifach verdünnten Schenckfiltrat fand sich, berechnet auf den ursprünglichen Vollpreßsaft, 0,557% bzw. 0,560% im Mittel 0,559%. Also auch hier war praktisch der ganze Phosphor des Vollpreßsaftes in das Schenckfiltrat übergegangen.

Unter der Voraussetzung, daß die milchsäurebildende Substanz überhaupt eine Phosphorverbindung ist, mußte sie also im Schenckfiltrat vorhanden sein.

¹⁾ Auch in der vorliegenden Arbeit berechnen wir alle Phosphor- und Phosphorsäurebestimmungen als H_3PO_4 .

Nunmehr suchten wir die organisch gebundene Phosphorsäure in ähnlicher Weise, wie es z. B. bei der Darstellung von Inosinsäure geschieht, d. h. durch Barytfällung, von der anorganischen zu trennen. Wir erwarteten, das Lactacidogen im Filtrate der Baryumfällung vorzufinden. Der nach Neumann bestimmte Gesamtphosphorsäuregehalt in diesem Filtrate war aber geringer, als wir nach unseren Erfahrungen über die Menge der Lactacidogenphosphorsäure im Muskelpreßsaft vermutet hatten.

Es mußte also entweder schon bei der Barytfällung, die in der Kälte vorgenommen war, Phosphorsäure aus dem Lactacidogen abgespalten sein, oder das Lactacidogen war in die Barytfällung übergegangen.

Der mit kaltem Wasser auf der Nutsche oder mittels der Zentrifuge gewaschene Baryumniederschlag wurde in der Reibschale — in allen späteren Versuchen unter Eiskühlung — mit 25%iger Schwefelsäure sorgfältig zersetzt, bis stark mineralsaure Reaktion dauernd bestehen blieb, und eine durch Zentrifugieren gewonnene klare Flüssigkeitsprobe sich als baryumfrei erwies. Nach Abtrennung des Baryumsulfats wurde in der gewonnenen Flüssigkeit der Gesamtphosphor und die anorganische Phosphorsäure bestimmt. Beide Bestimmungen wurden stets an gleichen Flüssigkeitsmengen — meist waren 5 ccm völlig ausreichend — vorgenommen. Die Bestimmung der Gesamtphosphorsäure geschah nach Neumann, jedoch wurde in einem Teil der Versuche der Phosphormolybdätniederschlag in Ammonium-Magnesium-Phosphat übergeführt und die Phosphorsäure schließlich als Magnesiumpyrophosphat gewogen. Die Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure geschah ganz in der von Embden, Griesbach und Schmitz für Preßsaftfiltrate geschilderten Weise.

Wir lassen nunmehr die Ergebnisse einiger derartiger Bestimmungen folgen:

Versuch 3.

In der in der eben geschilderten Weise gewonnenen schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeit wurde der Gesamtphosphor

und die anorganische Phosphorsäure bestimmt. Es fanden sich 0,585% Gesamtphosphorsäure und 0,275% anorganische Phosphorsäure. Dementsprechend waren 0,310% oder fast 53% der gesamten Phosphorsäure in «organischer Bindung» vorhanden.¹⁾

Versuch 4.

In einem weiteren Versuche wurden 10 ccm einer schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeit, die aus einer einmal umgefällten Baryumfällung von Preßsaftfiltrat gewonnen war, mit Magnesianixtur gefällt und im Magnesiumniederschlag die Gesamtphosphorsäure bestimmt. Es fanden sich — auf die Zersetzungsflüssigkeit bezogen — 0,427% H_3PO_4 ; im Filtrat der Magnesiafällung 0,593% H_3PO_4 . In diesem Falle waren in der Baryumfällung mindestens 60% der Gesamtphosphorsäure organisch gebunden.²⁾

Versuch 5.

Ein ganz entsprechendes Ergebnis fand sich in einem dritten Falle. Hier war die Baryumfällung des Preßsaftfiltrates unter besonders guter Kühlung vorgenommen. Die sämtlichen Bestimmungen wurden gravimetrisch ausgeführt. Die Menge der Gesamtphosphorsäure in der Zersetzungsflüssigkeit betrug 2,870%, die der anorganischen Phosphorsäure 0,905%. Dementsprechend waren 1,965% organische Phosphorsäure vorhanden oder 68% der Gesamtphosphorsäure der Zersetzungsflüssigkeit.

In weiteren Versuchen sahen wir davon ab, das Fleisch zu pressen, sondern zerkleinerten es nur möglichst schnell

¹⁾ Im Filtrate der ersten Magnesiafällung fanden sich nach der Veraschung 0,0361 g H_3PO_4 oder — auf die untersuchte Flüssigkeit bezogen — 0,240%. Die Summe der anorganischen Phosphorsäure: 0,275% und der organischen Phosphorsäure im Filtrate der ersten Magnesiafällung: 0,240% beträgt 0,515%, die Gesamtphosphorsäure, wie oben erwähnt, 0,585%, so daß in diesem Falle 0,070% organische Phosphorsäure mit dem ersten Magnesianiederschlag ausgefällt war.

²⁾ Da der Phosphor der Magnesiafällung wahrscheinlich zum Teil auch organischer Natur war (siehe die vorangehende Fußnote), muß dieser Wert für organische Phosphorsäure als Minimalwert betrachtet werden.

und fein (in einem Teil der Versuche unter Kühlung mit Eis) mit einer Fleischhackmaschine. Der so gewonnene Muskelbrei wurde mit dem dem Muskelgewichte entsprechenden Volumen 4%iger Salzsäure versetzt und blieb etwa eine halbe Stunde mit der Salzsäure stehen, wobei die Muskulatur zu einer voluminösen teigigen Masse aufquoll. Nunmehr wurde die dem Muskelgewicht entsprechende Menge 5%iger Sublimatlösung unter starkem Rühren hinzugefügt. Die Rührung wurde maschinell mehrere (zwei- bis vier) Stunden fortgesetzt, wobei die Muskulatur sehr rasch entquoll. Die Flüssigkeit blieb über Nacht im Eisschrank stehen. Das am nächsten Morgen durch Absaugen gewonnene eiweißfreie Filtrat wurde in der üblichen Weise entquecksilbert und vom Schwefelwasserstoff befreit. Diese Flüssigkeiten wurden ebenso wie die Preßsaftfiltrate zur Barytfällung verwendet. Für die Gewinnung der Baryumfällung in größerem Maßstabe gingen wir stets direkt vom zerkleinerten Fleisch aus. Meist verwandten wir im Einzelversuch etwa 5 kg Muskulatur.

Versuch 6.

Ein in der eben geschilderten Weise gewonnener Baryumniederschlag wurde mit Schwefelsäure zersetzt. Die Menge der Gesamtphosphorsäure betrug 3,094% der untersuchten Flüssigkeit, die der anorganischen 2,194%. Dementsprechend die der organischen 0,900% der untersuchten Flüssigkeit oder etwa 29% der Gesamtphosphorsäure.

Versuch 7.

Ganz ähnlich wie die Hundemuskulatur verhielt sich auch Pferdefleisch, das möglichst rasch nach der Schlachtung gewonnen war und unter Eiskühlung ins Institut gebracht wurde. Die Verarbeitung war die gleiche wie im vorigen Versuch. Die Zersetzungsflüssigkeit der Baryumfällung enthielt 2,898% Gesamtphosphorsäure und 1,986% anorganische Phosphorsäure, also 0,912% organische Phosphorsäure = 31% der Gesamtphosphorsäure.

In einem weiteren, an Hundemuskeln vorgenommenem Versuch wurde ein ganz ähnliches Ergebnis gewonnen.

Wie man sieht, ist die Menge der bei der direkten Verarbeitung zerkleinerter Hundemuskelatur in die Baryumfällung übergehenden organischen Phosphorsäure im Verhältnis zur anorganischen merklich geringer als bei der Verarbeitung des Preßsaftes. Dies dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß bei der Preßsaftgewinnung ein größerer Teil der anorganischen Phosphorsäure in Form schwerlöslicher Erdalkalisalze im Preßrückstande verbleibt, während bei dem direkten Versetzen des Fleisches mit verdünnter Salzsäure die Phosphorsäure leicht in Lösung geht.

Übereinstimmend geht aus den eben besprochenen Versuchen hervor, daß die Baryumfällung aus den nach Schenck gewonnenen Muskelextrakten neben anorganischer Phosphorsäure sehr erhebliche, unter Umständen (Preßsaftversuche) überwiegende Mengen organische Phosphorsäure enthält.

Die durch Zersetzung der Barytfällung mit Schwefelsäure gewonnenen Flüssigkeiten zeigten einige sehr auffällige Eigenschaften.

Wir untersuchten zunächst ihr Verhalten gegen Fehling'sche Lösung. Regelmäßig zeigten sie ein ganz erhebliches Reduktionsvermögen. In vielen Fällen bestimmten wir das Reduktionsvermögen nach Maquenne¹⁾. Die Reduktion entsprach — auf Traubenzucker bezogen — Werten bis zu 0,5%.

Mit α -Naphthol und Schwefelsäure trat intensive Violett-färbung ein.

Die Orcinreaktion war stets sehr stark positiv. Das spektrale Verhalten der bei dieser Reaktion gewonnenen amyloalkoholischen Auszüge unterschied sich nicht von dem der Pentosen.

Mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung erwärmt, bildeten sich osazonartige Verbindungen, die allerdings nur schwierig und unvollkommen zur Kristallisation zu bringen waren. Anscheinend enthielten diese Reaktionsprodukte organisch gebundenen Phosphor.

Die untersuchten Lösungen waren fast stets optisch

¹⁾ Siehe Griesbach und Straßner, Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 199, 1913.

aktiv. Wenn die Verarbeitung an zerkleinertem Fleisch und unter sorgfältiger Kühlung vorgenommen wurde, drehten sie manchmal schwach, manchmal ganz erheblich (bis über 1°) im 4 dcm-Rohr nach links. Beim Sieden der schwefelsauren Lösung unter Rückfluß, langsamer beim Erwärmen auf Temperaturen wenig über 50° wird die Linksdrehung allmählich schwächer, um schließlich in eine immer deutlichere Rechtsdrehung überzugehen, bis nach weiterem Erwärmen die Rechtsdrehung unter Auftreten gefärbter Zersetzungsprodukte wieder abnimmt. Während des Siedens nimmt die Menge der anorganischen Phosphorsäure, ebenso auch das Reduktionsvermögen allmählich zu. Als Beispiele seien folgende zwei Versuche angeführt.

Versuch 8.

Es betrug die Drehung einer schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeit anfänglich im 4 dcm-Rohr $-0,16^\circ$. Die stark schwefelsaure Lösung wurde auf 90° erwärmt. Nach 10 minutenlangem Erwärmen wurde ein Drehungswinkel von $+0,07^\circ$

nach 20 Minuten	»	»	»	»	$+0,28^\circ$
» 30	»	»	»	»	$+0,43^\circ$
» 70	»	»	»	»	$+0,73^\circ$

abgelesen.

Nunmehr wurde die Flüssigkeit 90 Minuten lang auf 100° erwärmt. Hiernach betrug die Drehung annähernd $+1,0^\circ$.

Versuch 9.

Die schwefelsaure Zersetzungsflüssigkeit eines gewaschenen Barytniederschlags aus Pferdemusculatur drehte im 4 dcm-Rohr $-1,35^\circ$.

Sie wurde während 50 Minuten unter Rückfluß im Sieden erhalten. Darnach betrug die Drehung $+0,44^\circ$, nach weiterem einhalbstündigem Sieden $+0,74^\circ$. Zu Beginn des Versuchs befanden sich in der Lösung 1,864% anorganischer Phosphorsäure, nach 50 minutenlangem Erhitzen 2,332%.

Die Reduktion, auf Traubenzucker berechnet, hatte einen Anfangswert von 0,190%. Sie war nach 50 Minuten auf 0,459%, nach weiteren 30 Minuten auf 0,528% gestiegen.

Von besonderer Bedeutung erschien uns die biologische Prüfung der aus Barytfällungen gewonnenen Zersetzungsflüssigkeiten durch Muskelpreßsaft. Es gelang ohne weiteres zu zeigen, daß die Barytfällung¹⁾ den Umfang der Milchsäurebildung und in vielen Fällen auch die Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft zu steigern vermag, wodurch sicher dargetan ist, daß das Lactacidogen mit Baryum fällbar ist. Ehe wir auf die an Preßsäften unter Zusatz von Lactacidogenlösungen gewonnenen Ergebnisse näher eingehen, möchten wir einige weitere Isolierungsversuche kurz besprechen.

Zunächst bemühten wir uns, das Lactacidogen von der anorganischen Phosphorsäure zu trennen. Unter verschiedenen Bedingungen vorgenommene Versuche, die anorganische Phosphorsäure als Ammoniummagnesiumphosphat abzuscheiden, während das Lactacidogen in Lösung blieb, führten nicht zum Ziel, teils deswegen, weil das Lactacidogen — wenigstens zum Teil — auch bei Fällung aus sehr verdünnter Lösung mit der anorganischen Phosphorsäure ausfiel, teils weil es allem Anscheine nach gegen die Behandlung mit stark ammoniakalischer Lösung auch bei sehr niederer Temperatur recht empfindlich ist.

Auch Versuche, nach vorheriger Abscheidung der Phosphorsäure als Ammoniumphosphormolybdat von anorganischer Phosphorsäure freie Lactacidogenlösungen zu gewinnen, führten einstweilen nicht zum Ziel.

Die aus der Baryumfällung durch Zersetzen mit Schwefelsäure gewonnenen Flüssigkeiten enthalten stets reichliche Mengen Magnesium, das natürlich bei der Barytfällung mit in den Niederschlag geht. Die Beseitigung des Magnesiums und der etwa noch anhaftenden geringen Mengen von Alkalisalzen gelingt leicht, wenn man die schwefelsauren aus der Baryumfällung gewonnenen Lösungen mit Bleizucker fällt. Hierbei wird neben der Schwefelsäure und der anorganischen Phosphorsäure auch die organische Phosphorsäure zum weitaus größten Teile ausgefällt. Vermeidet man bei der Bleizuckerfällung jeden

¹⁾ Im folgenden gebrauchen wir den Ausdruck «Barytfällung» zum Teil, der Kürze halber, auch für die aus der Barytfällung nach Beseitigung des Baryums mit Schwefelsäure gewonnenen Flüssigkeiten.

erheblichen Überschuß des Fällungsmittels, so läßt sich aus dem Filtrat durch vorsichtigen weiteren Zusatz von Bleiessig (oder Bleizucker) und Ammoniak eine Fällung erzeugen, die — bis auf manchmal noch vorhandene geringfügige Spuren anorganischer Phosphorsäure — Phosphor ausschließlich in organischer Bindung enthält.

Im folgenden werden wir die beiden aus der Zersetzungsflüssigkeit der Barytfällung gewonnenen Bleifällungen kurz als »Bleizuckerfällung« und »Bleiessigammoniakfällung« bezeichnen. Die Bleizuckerfällung wurde stets gründlich mit kaltem Wasser auf der Nutsche gewaschen, ein oder mehrere Male wurde sie während des Waschens in der Reibschale sorgfältig mit Wasser verrieben. Wird die Bleizuckerfällung wieder mit 25%iger Schwefelsäure in der Kälte zersetzt, wobei soviel Schwefelsäure hinzugefügt wird, daß kein Blei mehr in Lösung ist, so erhält man wiederum eine stark reduzierende Flüssigkeit, die bis auf das Fehlen von Magnesium alle Eigenschaften der Barytfällung aufweist. Insbesondere wird Fehlingsche Lösung reduziert, es tritt starke Orcinreaktion ein, die Flüssigkeit enthält reichlich organische Phosphorsäure und ist optisch aktiv.

Nimmt man die Darstellung der Baryum- und Bleizuckerfällungen unter Vermeidung stärkeren Erwärmens vor, so dreht die Bleizuckerfällung nach links, im Gegensatz dazu weist die nach gründlichem Waschen des Bleiessigammoniakniederschlags mit kaltem Wasser durch langes Einleiten von Schwefelwasserstoff in die wässrige Suspension des Niederschlags gewonnene Flüssigkeit fast ausnahmslos Rechtsdrehung auf. Die Orcinreaktion findet sich auch in der Bleizuckerammoniakfällung, wenn auch weit schwächer als in der Baryum- und Bleizuckerfällung. Das Reduktionsvermögen der zersetzten Bleiessigammoniakfällung ist oft ein ausserordentlich beträchtliches. Auch diese Fraktion bildet im Muskelpreßsaft Milchsäure, und unter gewissen Umständen auch Phosphorsäure. Daß die zersetzte Bleiessigammoniakfällung Phosphorsäure nur oder fast nur in organischer Bindung enthält, wurde schon erwähnt.

Sowohl aus zersetzten Bleizuckerfällungen, wie aus zersetzten Bleiessigammoniakfällungen versuchten wir auf ver-

schiedene Weise, das Lactacidogen zur Abscheidung zu bringen, ohne bisher zu befriedigenden Ergebnissen zu gelangen. Wir wollen auf diese zahlreichen Versuche hier nicht weiter eingehen, sondern nur eine Versuchsanordnung schildern, die zu der Feststellung führte, daß das Lactacidogen keineswegs die einzige organische Phosphorverbindung im Muskelextrakt ist, die mit Baryt und Bleizucker ausgefällt wird.

Versetzt man die schwefelsaure Zersetzungsflüssigkeit aus der Bleizuckerfällung mit dem dreifachen Volumen Aceton, so erhält man, falls die vorhergehende Verarbeitung rasch und unter ausreichender Kühlung erfolgte, einen reichlichen flockigen Niederschlag. Nach der Filtration auf der Nutsche und gründlichem Waschen mit einer Mischung aus drei Teilen Aceton und einem Teil Wasser bis zur völligen Schwefelsäurefreiheit und Trocknung des Niederschlags durch Waschen mit Aceton, Aether und niedrig siedendem Petroläther gewinnt man eine gelblich gefärbte Substanz, die durch Lösung in $n/1$ -Schwefelsäure und Wiederfällung mit Aceton gereinigt werden kann.

In Wasser und Essigsäure ist die Substanz nur äußerst schwer löslich. In Natronlauge löst sie sich unter schöner Rotfärbung. Aus ihrer schwefelsauren Lösung ist sie mit Phosphorwolframsäure fällbar. Offenbar ist diese Substanz die Trägerin der Orcinreaktion in der Baryt- und Bleizuckerfällung. Sie gibt diese Reaktion mit ganz ausserordentlicher Intensität. Bei der Furfurolbestimmung nach dem Kröber-Tollens'schen Verfahren liefert sie eine Furfurolmenge, die auf einen reichlichen Pentosengehalt schließen läßt. Wir haben eine Reihe von Analysen der Substanz ausgeführt, auf die wir im einzelnen nicht eingehen wollen, weil wir, obwohl drei verschiedene Präparate sehr gut übereinstimmende Phosphor- und Stickstoff-, mehrere Präparate auch gut stimmende Kohlenstoff- und Wasserstoffwerte lieferten, den Körper noch nicht für völlig rein halten. Wir wollen nur hervorheben, daß er etwas über 13% P und annähernd 14% N enthielt und behalten uns weitere Versuche über seine Konstitution für eine besondere Arbeit vor. Wir wollen hier nur noch folgendes erwähnen:

Die schwefelsaure Lösung der Substanz ist stark links-

drehend und reduziert Fehling'sche Lösung nicht. Beim Sieden mit verdünnter Schwefelsäure geht die Linksdrehung allmählich in Rechtsdrehung über. Es tritt anorganische Phosphorsäure auf und die Lösung gewinnt ein gewisses Reduktionsvermögen.

Als stickstoffhaltiges Spaltungsprodukt der Substanz konnten wir mit ziemlicher Leichtigkeit reichliche Mengen von Adenin gewinnen.

Die geschilderten Eigenschaften, namentlich das Vorhandensein organisch gebundener Phosphorsäure, die deutlichen Hinweise auf die Anwesenheit einer Pentosengruppe, sowie das Auftreten von Adenin bei der Säurespaltung weisen darauf hin, daß es sich hier um eine zur Gruppe der Nucleinsäuren gehörige Substanz handelt. Wir bitten die Fachgenossen, die weitere Bearbeitung auch dieses Körpers uns für einige Zeit zu überlassen.

Im Gegensatz zum Verhalten der Barytfällung, der Bleizucker- und der Bleizuckerammoniakfällung erwies sich die eben geschilderte Substanz als unfähig, den Umfang der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft zu steigern.

Wir gehen nunmehr zur Besprechung der Versuche über, in denen wir dem Muskelpreßsaft Lactacidogenlösungen zufügten.

Alle Einzelversuche wurden an 80 ccm Preßsaft angestellt. Den Ansätzen, die zum zweistündigem Stehen bei 40° bestimmt waren, wurden 10 ccm gesättigter Natriumbicarbonatlösung hinzugefügt, außerdem eine Menge Ringerlösung (ohne Zucker und Bicarbonat), die der im Parallelversuch zugesetzten Lactacidogenlösung entsprach. Als Lactacidogenlösungen wurden zum Teil mit Schwefelsäure zersetzte Baryt- oder Bleizuckerfällungen verwendet, die letzteren in einem Teil der Versuche nach Fällung mit dem dreifachen Volumen Aceton und Entfernung des Acetons aus dem Filtrat der Acetonfällung im Vakuum. In weiteren Versuchen dienten die mit Schwefelwasserstoff zersetzten Bleiessigammoniaklösungen als Zusatzsubstanzen.

Alle Lösungen wurden vor dem Versuch sorgfältig mit Natronlauge neutralisiert, so daß blaues Lakmuspapier eben gerade nicht mehr gerötet wurde. Zwei Versuche wurden auch

mit der eben geschilderten, durch Aceton fällbaren Substanz vorgenommen, die zu dem Zwecke in Schwefelsäure aufgelöst und dann bis zu dem eben erwähnten Punkte mit Natronlauge versetzt worden war. Wie bereits erwähnt, war der Zusatz von Acetonfällung ohne merklichen Einfluß auf den Umfang der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung.

In der nachstehenden Tabelle sind aus den Kolonnen 2—7¹⁾ die ohne Zusatz von Lactacidogen gewonnenen Ergebnisse, aus den Kolonnen 8—13 die unter Zusatz von Lactacidogen gewonnenen Resultate ersichtlich. Die Stäbe 6 und 7 geben die Menge der in 100 ccm Preßsaft ohne Lactacidogenzusatz neugebildeten Milchsäure und Phosphorsäure an, die entsprechenden unter Lactacidogenzusatz gewonnenen Werte finden sich in den Stäben 12 und 13.

Wie man sieht, trat unter dem Einfluß des Lactacidogenzusatzes regelmäßig eine zum Teil sehr erhebliche Mehrbildung von Milchsäure ein. Das geht am besten aus Kolonne 14 hervor, in der diese Mehrbildung direkt berechnet ist. Mit Ausnahme von Versuch 14b liegt sie außerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung. Ihr Umfang erreichte in einem allerdings aus der Reihe fallenden Versuch den Wert von nahezu 0,2 %. Ähnlichen Werten werden wir bei etwas abweichender Versuchsanordnung in einer nachfolgenden Arbeit begegnen.

Auch die Phosphorsäurebildung ist in einem Teil der Versuche (Versuch 10, 11, 12, 13, 14b, 18, 20a) deutlich. In den übrigen Versuchen wird durch Lactacidogenzusatz keine Mehrbildung von Phosphorsäure hervorgerufen. In zwei Versuchen ist sogar die in dem Leerversuch erfolgende Bildung von Phosphorsäure deutlich gehemmt (V. 14a und 22b).

Da wir keine Ursache haben, das Ausbleiben der Phosphorsäurebildung in einem großen Teil der Versuche und die Hemmung der bereits im Leerversuch erfolgenden Phosphorsäurebildung auf bestimmungstechnische Fehler zurückzuführen,

¹⁾ Die Leerwerte der ersten vier Versuche wurden bereits in der voranstehenden Arbeit von Embden, Griesbach und Schmitz an den aus den Bemerkungen zu den Einzelversuchen der Tabelle hervorgehenden Stellen veröffentlicht.

müssen wir, unter der Voraussetzung, daß unsere Vorstellung von der Struktur des Lactacidogens richtig ist, annehmen, daß der Phosphorsäurekomplex im Lactacidogen außer an Kohlehydrat noch an eine andere Komponente gebunden ist, so daß die Bildung von Milchsäure nicht ohne weiteres mit einer Bildung von Phosphorsäure verbunden zu sein braucht. Wir möchten glauben, daß in einem Teil der Versuche der Salzgehalt oder irgend eine andere Verunreinigung der Lactacidogenlösungen den totalen Zerfall des Lactacidogenmoleküls unter Freiwerden von Phosphorsäure hemmten, so daß die Bindung der Phosphorsäure an die noch unbekannte Komponente bestehen blieb. Für die Natur dieser noch unbekanntes Komponente des Lactacidogens haben wir keinerlei Anhaltspunkte gewonnen.

In den Versuchen 19b und 22a wurde als Zusatzsubstanz der oben besprochene mit Aceton fällbare Körper aus der Bleizuckerfraktion verwendet. Er blieb, wie bereits erwähnt, ohne merklichen Einfluß auf den Umfang der Milchsäurebildung, in Versuch 19b blieb auch die Phosphorsäurebildung unbeeinflusst, während in Versuch 22a eine deutliche Hemmung der Phosphorsäurebildung eintrat. Jedenfalls wurde also das Freiwerden von Phosphorsäure aus den zugesetzten Lösungen in den positiv verlaufenden Versuchen nicht durch den Gehalt dieser Zusätze an acetonfällbarer Substanz hervorgerufen.

Wir wollen ausdrücklich hervorheben, daß auch in den Versuchen, die sowohl Milchsäure- wie Phosphorsäurebildung aufweisen, ein strenger Parallelismus zwischen Milchsäure und Phosphorsäurebildung nicht vorhanden ist. In einem Teil der Versuche (Vers. 11, 13, 14b) überwiegt die Phosphorsäurebildung, in einem anderen (Vers. 10, 12, 18, 20a) die Milchsäurebildung deutlich. Es ist wohl an die Möglichkeit zu denken, daß bei der Darstellung des Lactacidogens das Lactacidogenmolekül bereits bis zu einem gewissen Grade verändert wird, so daß es nicht mit der gleichen Vollkommenheit wie die von vorneherein im Muskelpreßsaft vorhandene Substanz in Milchsäure und Phosphorsäure zerfällt. Hierüber wird wohl erst die Reindarstellung des Lactacidogens vollkommene Klarheit bringen.

Ta-
belle.

1 Nr. des Ver- suchs	Ohne Lactacidogen						Mit		Lactacidogen				Aus Lactacidogen		16 Bemerkungen
	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B neugebildete		Milchsäure in 100 ccm des		Phosphor- säure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete		in 100 ccm Preßsaft neugebildete		
	sofort verar- beiteten Preß- saftes A	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B	sofort verar- beiteten Preß- saftes A	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B	Milch- säure	Phos- phor- säure	sofort verar- beiteten Preß- saftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B ₁	sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₁	Milch- säure	Phos- phor- säure	Milch- säure	Phos- phor- säure	
	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
10	0,3145	0,4306	0,1585	0,2748	0,1161	0,1163	0,3261	0,5042 0,5083	0,4343	0,5950 0,5828	0,1781 0,1822	0,1607 0,1485	0,0620 0,0661	0,0444 0,0322	Zum Zusatz wurde Barytfällung aus Preßsaftfiltrat nach Zerlegung mit Schwefelsäure und Neutralisation der Ba-freien Lösung mit Natronlauge verwendet. Leerversuch bereits als Versuch 48 der Tabelle 4 einer vorausstehenden Arbeit von Embden, Griesbach und Schmitz veröffentlicht.
11	0,3982	0,5373	0,2092	0,3382	0,1391	0,1290	0,4279	0,6412	0,3847	0,6230	0,2133	0,2383	0,0742	0,1093	Als Zusatzsubstanz einmal umgefällte Ba-Fällung aus Preßsaftfiltrat von Hundemuskel, wie im vorigen Versuch zerlegt und neutralisiert. Leerversuch auch in Tabelle 4 von Embden, Griesbach und Schmitz als Versuch 49 veröffentlicht.
12	0,4644	0,5359 0,5528	0,2764	0,3614 0,3646	0,0715 0,0884	0,0850 0,0882	0,4664	0,6068	0,5273	0,6547	0,1404	0,1274	0,0689 0,0520	0,0424 0,0392	Als Zusatzsubstanz Ba-Fällung aus Schenckfiltrat von zerkleinerter Hundemuskulatur. Leerversuch auch in Tabelle 4 von Embden, Griesbach und Schmitz Versuch 50.
13	0,3145	0,3989	0,2552	0,3382	0,0844	0,0830	0,3260	0,4718	0,7170	0,8985	0,1458	0,1815	0,0614	0,0985	Herstellung der zugesetzten Lösung wie im vorigen Versuch. Leerversuch auch in der Arbeit von Embden, Griesbach und Schmitz Tabelle 4, Versuch 51.
14 a	0,4280	0,5170	0,2637	0,3416	0,0890	0,0779	0,4050	0,6939	0,8534	0,8946	0,2889!	0,0412	0,1999!		Als Zusatzsubstanz Ba-Fällung aus Schenckfiltrat von zerkleinerter Hundemuskulatur.
14 b							0,4414	0,5589	1,5075	1,6386	0,1175	0,1311	0,0285	0,0532	Als Zusatzsubstanz bleifreie Bleizuckerfällung.

Tabelle (Fortsetzung).

1	2						3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		
	Ohne Lactacidogen												Mit		Lactacidogen				Aus Lactacidogen				Bemerkungen												
Nr. des Versuchs	Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B neugebildete		Milchsäure in 100 ccm des		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete		Phosphorsäure in 100 ccm des		In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete		Aus Lactacidogen in 100 ccm Preßsaft neugebildete		Bemerkungen																
	sofort verarbeiteten Preßsaftes A	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B	sofort verarbeiteten Preßsaftes A	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B	Milchsäure	Phosphorsäure	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁	sofort verarbeiteten Preßsaftes A ₁	nach dem Stehen bei 40° verarbeiteten Preßsaftes B ₁	Milchsäure	Phosphorsäure	Milchsäure	Phosphorsäure	Milchsäure	Phosphorsäure	Milchsäure	Phosphorsäure																	
	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
15	0,3834	0,5386	0,2283	0,3413	0,1552	0,1130	0,3982	0,6115	0,6420	0,7551	0,2133	0,1131	0,0581	Keine Mehrbildung.	Als Zusatzsubstanz Ba-Fällung aus Pferdefleisch.																				
16 a	0,3929	0,4981	0,2330	0,3213	0,1052	0,0883	0,3929	0,5494	1,0193	1,0896	0,1565	0,0703	0,0513	Keine Mehrbildung	Als Zusatzsubstanz schwefelsaure Zersetzung eines Bleizuckerniederschlags, mit Natronlauge neutralisiert.																				
16 b							0,3881	0,5238	0,2330	0,3271	0,1357	0,0941	0,0305	Keine Mehrbildung	Als Zusatzsubstanz Bleiessig-Ammoniakfällung, nach der Entbleiung mit NaOH neutralisiert. Die Lösung enthielt 0,29% organische Phosphorsäure, nur Spuren anorganischer Phosphorsäure.																				
17 a	0,4327	0,5258	0,2219	0,2938	0,0931	0,0719	0,4408	0,5825	0,6473	0,7123	0,1417	0,0650	0,0486	Keine Mehrbildung	Zusatz: Bleizuckerfällung nach Entfernung der acetonfällbaren Substanz, mit Natronlauge neutralisiert.																				
17 b							0,4543	0,6014	0,6240	0,6901	0,1471	0,0661	0,0540	Keine Mehrbildung	Dasselbe wie Versuch 8a, nur wurde die Hauptmenge der Schwefelsäure durch Baryt entfernt.																				
18	0,5130	0,6318	0,3075	0,3804	0,1188	0,0729	0,5130	0,7162	0,3170	0,4201	0,2032	0,1031	0,0844	0,0302	Als Zusatzsubstanz Bleiessig-Ammoniakfällung mit Natronlauge neutralisiert.																				
19 a							0,5744	0,8012	0,6362	0,7809	0,2268	0,1447	0,0742	Keine deutliche Mehrbildung	Als Zusatzsubstanz Ba-Fällung.																				
19 b	0,5420	0,6946	0,2658	0,4016	0,1526	0,1358	[0,5420]	0,7148	0,2631	0,3936	0,1728	0,1305	Keine deutliche Mehrbildung	Keine Mehrbildung	Als Zusatzsubstanz zu A ₁ und B ₁ , je ca. 0,12 g Acetonfällung. Für den Milchsäuregehalt A ₁ wurde der im Leerversuch ermittelte eingesetzt.																				

Tabelle (Fortsetzung).

1 Nr. des Ver- suchs	2 Ohne Lactacidogen						3 Mit		4 Lactacidogen				5 Aus Lactacidogen		6 Bemerkungen
	7 Milchsäure in 100 ccm des		8 Phosphorsäure in 100 ccm des		9 In 100 ccm des Preßsaftes B neugebildete		10 Milchsäure in 100 ccm des		11 Phosphor- säure in 100 ccm des		12 In 100 ccm des Preßsaftes B ₁ neugebildete		13 in 100 ccm Preßsaft neugebildete		
	14 sofort verar- beiteten Preß- saftes A g	15 nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B g	16 sofort verar- beiteten Preß- saftes A g	17 nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B g	18 Milch- säure g	19 Phos- phor- säure g	20 sofort verar- beiteten Preß- saftes A ₁ g	21 nach dem Stehen bei 40° verar- beiteten Preß- saftes B ₁ g	22 sofort ver- arbei- teten Preß- saftes A ₁ g	23 nach dem Stehen bei 40° ver- arbei- teten Preß- saftes B ₁ g	24 Milch- säure g	25 Phos- phor- säure g	26 Milch- säure g	27 Phos- phor- säure g	
20 a	0,5042	0,6743	0,2219	0,3926	0,1701	0,1707	0,5211	0,7580	0,6631	0,8840	0,2369	0,2209	0,0668	0,0502	Als Zusatzsubstanz Barytfällung.
20 b							0,5137	0,7189	0,2277	0,3968	0,2052	0,1691	0,0351	Keine Mehr- bildung	Als Zusatzsubstanz Bleiessig-Ammoniakfällung. Die Lösung enthielt 0,47% organische Phosphorsäure.
21 a	0,4630	0,5792	—	—	0,1162	—	0,4644	0,6440	—	—	0,1796	—	0,0634	—	Als Zusatzsubstanz Barytfällung.
21 b							0,4617	0,6224	—	—	0,1607	—	0,0445	—	Als Zusatzsubstanz Bleiessig-Ammoniakfällung.
22 a	0,5211	0,7222	0,2182	0,4296	0,2011	0,2114	0,5211	0,7452	0,2230	0,3958	0,2241	0,1728	Keine deut- liche Mehr- bildung	Hemmung der Phos- phorsäure- bildung	0,5 g Acetonfällung in 20 ccm n/s-H ₂ SO ₄ gelöst und mit 27 ccm n/s-Natronlauge neutralisiert, 47 ccm Flüssigkeit. Hiervon je 20 ccm als Zusatz. Als A-Wert der Milchsäure wurde der im Leerversuch gefundene angenommen.
22 b							0,5251	0,7951	0,3336	0,8021	0,2700	0,1685	0,0689	Hemmung der Phos- phorsäure- bildung	Als Zusatzsubstanz: Filtrat der Acetonfällung.

Wir haben bereits in einer voranstehenden Arbeit die Vermutung ausgesprochen, daß das Lactacidogen einen Kohlenhydratphosphorsäurekomplex enthält, und die Tatsache, daß sich durch Barytfällung sowie Bleifällung eine Fraktion gewinnen läßt, die allem Anschein nach ein reduzierendes, an Phosphorsäure gebundenes Kohlenhydrat enthält, bildet eine wertvolle Stütze für diese Vermutung.

Freilich durfte aus dem bloßen Vorhandensein eines reduzierenden, anscheinend an Phosphorsäure gebundenen Komplexes in der Baryumfällung noch nicht geschlossen werden, daß gerade diese Verbindung als Quelle der Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft anzusehen sei. Wenn unsere Annahme zutreffen sollte, so mußte während zweistündigen Stehens von Muskelpreßsaft bei 40° unter Natriumbicarbonatzusatz die von vorneherein aus ihm durch Baryumfällung darstellbare kohlenhydratphosphorsäurehaltige Substanz stark abgenommen haben, da ja unter diesen Umständen die Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft im wesentlichen zum Abschluß gelangt ist.

In den Versuchen 23 und 24 ließ sich nun zeigen, daß in der Tat die erwähnte mit Baryt fällbare Substanz während der genannten Versuchszeit nahezu völlig aus dem Preßsaft verschwindet.

Versuch 23.

480 ccm eines frisch unter Kühlung gewonnenen Muskelpreßsaftes wurden nach Schenck im Verhältnis 1 : 3 gefällt. 480 ccm desselben Preßsaftes blieben unter Zusatz von 60 ccm gesättigter Natriumbicarbonatlösung während 2 Stunden bei 40° stehen und wurden dann ebenfalls unter dreifacher Verdünnung des ursprünglichen Preßsaftvolumens nach Schenck gefällt.

Die Flüssigkeiten blieben über Nacht im Eisschrank. Gleiche, gemessene Mengen der am nächsten Morgen in bekannter Weise gewonnenen Filtrate, je 1200 ccm, die je 400 ccm Muskelpreßsaft entsprachen, wurden unter Eiskühlung mit gleichen Mengen (77 g) Ätzbaryt vollkommen ausgefällt.

Unter dauernder Kühllhaltung wurden die Barytniederschläge auf gleich großen Nutschen abgesaugt und wiederholt mit gleichen Mengen gekühlten Wassers gewaschen. Die Niederschläge wurden darauf unter Zusatz von 20 ccm Wasser in der Reibschale fein verteilt und unter sorgfältiger Eiskühlung mit je 12 ccm 25%iger Schwefelsäure zersetzt, so daß in beiden Flüssigkeiten Schwefelsäure im Überschuß vorhanden war. Die schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeiten wurden samt dem Baryumsulfatniederschlag auf 51 ccm aufgefüllt. Die nach Abtrennung des Baryumsulfats gewonnenen, klaren, schwach gelblich gefärbten Flüssigkeiten wurden nach Maquenne titriert, wobei je 5 ccm der Flüssigkeiten verwendet wurden. In der aus dem sofort verarbeiteten Preßsaft gewonnenen Lösung trat eine Reduktion auf, die einer Traubenzuckerlösung von 0,332% entsprach, während die Lösung, zu deren Gewinnung der Preßsaft nach 2stündigem Stehen bei 40° gedient hatte, nur eine ganz geringe Spur von Reduktionsvermögen aufwies (rechnerisch gleich einer 0,022%igen Traubenzuckerlösung).

Versuch 24.

Eine Wiederholung des Versuchs führte zu dem gleichen Ergebnis. Hier wurden nur je 1000 ccm des einer dreifachen Preßsaftverdünnung entsprechenden Schenckfiltrates verarbeitet. Sonst waren alle Einzelheiten der Versuchsanordnung die gleichen wie in Versuch 23. Von den Endlösungen zeigte die aus dem sofort verarbeiteten Preßsaft gewonnene Lösung A, bei der Titration nach Maquenne eine einer Traubenzuckerlösung von 0,326% entsprechende Reduktion, in dem nach zweistündigem Stehen bei 40° verarbeiteten Flüssigkeitsanteil (Lösung B) fand sich nur ein sehr geringes Reduktionsvermögen (rechnerisch 0,035%).

Der Gesamtphosphorgehalt beider Lösungen war praktisch identisch: 2,442% H_3PO_4 in Lösung A und 2,438% in Lösung B. Die Menge der anorganischen Phosphorsäure hatte dagegen, wie das nicht anders zu erwarten war, beim Stehen erheblich zugenommen. Sie betrug in A 1,278% in B 1,800%. Dem-

zufolge waren von der Gesamtposphorsäure des nach sofortiger Verarbeitung des Preßsaftes gewonnenen Barytniederschlags nahezu 48% organisch gebunden, von dem nach zwei-stündigem Stehen bei 40° gewonnenen Niederschlag nur etwas über 26%. Die Abnahme der organischen Phosphorsäure um etwa 21,4% der Gesamtposphorsäure und um fast 45% der von vornherein vorhandenen organischen Phosphorsäure während des Stehens des Preßsaftes dürfte im wesentlichen auf Kosten von Lactacidogenphosphor erfolgt sein, während der verbleibende organische Phosphor in der Hauptmenge wohl der nucleinsäureartigen, acetonfällbaren Substanz angehörte, die nach dem Ergebnis dieser Bestimmungen in dem vorliegenden Versuche in etwas größerer Menge als das Lactacidogen vorhanden war.

In den beiden eben beschriebenen Versuchen (Vers. 23 u. 24) war die Endflüssigkeit sehr deutlich optisch aktiv und zwar linksdrehend. Die Linksdrehung der Lösung B war stärker als die der Lösung A. In Versuch 24 drehte Lösung A im 4-dcm-Rohr: $-0,58^\circ$, Lösung B: $-0,84^\circ$.

Wir haben oben gesehen, daß die mit Aceton fällbare Substanz in saurer Lösung eine sehr beträchtliche Linksdrehung aufweist. Die Zunahme der Linksdrehung während des Stehens bei 40°, wobei dieser Körper allem Anschein nach nicht angegriffen wird, darf wohl als ein Hinweis darauf betrachtet werden, daß das (während des Stehens verschwindende) Lactacidogen nach rechts dreht. Hiermit stimmt die Tatsache überein, daß Bleizucker-Ammoniaklösungen, die anscheinend völlig oder annähernd frei von der eben erwähnten nucleinsäureartigen Substanz sind, tatsächlich starke Rechtsdrehung zeigen. Freilich ist möglicherweise das Lactacidogen dieser Fällung schon etwas in seiner Zusammensetzung verändert.¹⁾

Das Verschwinden des mit Baryt fällbaren, reduzierenden, allem Anschein nach an Phosphorsäure gebundenen Kohlenhydratkomplexes bei denselben Versuchsbedingungen, unter denen die Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Muskel-

¹⁾ Siehe die folgende Arbeit von Embden, Griesbach und Laquer.

preßsaft bis zu Ende abläuft, steht jedenfalls im besten Einklange mit der Annahme, daß die erwähnte reduzierende Kohlenhydratphosphorsäureverbindung eben als die Quelle der Milchsäure- und Phosphorsäure im Muskelpreßsaft anzusehen ist.

Die wesentlichsten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind folgende:

1. Aus eiweißfreien Extrakten von Muskelpreßsaft oder zerkleinerter Muskulatur läßt sich durch Barytfällung ein Substanzgemenge gewinnen, das neben anorganischer Phosphorsäure reichlich organisch gebundenen Phosphor enthält.

2. Die aus der Barytfällung durch Zersetzen mit Schwefelsäure gewonnene Flüssigkeit reduziert Fehlingsche Lösung sehr stark, gibt intensive Orcinreaktion, und ist stark optisch aktiv.

3. Diese Flüssigkeit vermag die Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft unter geeigneten Versuchsbedingungen zu steigern. Sie enthält also das Lactacidogen.

4. Das Lactacidogen ist aus der schwefelsauren Zersetzung der Baryumfällung auch mit Bleizucker fällbar. Bei der Bleizuckerfällung gelöst bleibendes Lactacidogen läßt sich durch Bleiessig und Ammoniak ausfällen. Auch die Zersetzungsflüssigkeiten der Bleizuckerfällung und der Bleiessigammoniakfällung steigern den Umfang der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft.

5. Die mit Baryt fällbare reduzierende Substanz verschwindet durch zweistündiges Stehen des Muskelpreßsaftes bei 40° so gut wie vollständig.

Da unter den gleichen Versuchsbedingungen im Muskelpreßsaft die Milchsäure- und Phosphorsäurebildung abgelaufen ist, stimmt dieses Verhalten mit der Annahme überein, daß eben die baryumfällbare reduzierende Substanz, in der die reduzierende Gruppe allem Anschein nach an Phosphorsäure gebunden ist, als das Lactacidogen anzusehen ist.

6. Die Tatsache, daß in einem Teil der Versuche aus den zugesetzten Lactacidogenlösungen Milchsäure gebildet wurde, ohne daß eine entsprechende Menge Phosphorsäure frei wurde, spricht dafür, daß die Phosphorsäure im Lacta-

cidogen außer an Kohlenhydrat noch an einen anderen Molekularkomplex gebunden ist.

7. Neben dem Lactacidogen enthält die Barytfällung sicherlich noch andere organische Phosphorverbindungen. Eine stickstoffhaltige derartige Verbindung konnte durch Fällung der zersetzten Bleizuckerlösung mit Aceton dargestellt werden. Neben einem reichlichen Gehalt an organisch gebundener Phosphorsäure enthält diese Substanz offenbar eine Pentosegruppe. (Sie ist möglicherweise die alleinige Trägerin der den Baryum- und Bleizuckerfällungen eigentümlichen Orcinreaktion.)

Als stickstoffhaltiges Spaltungsprodukt konnte aus dem eben erwähnten Körper Adenin gewonnen werden. Es handelt sich offenbar um eine nucleinsäureartige Substanz. Auf den Umfang der Milchsäure- und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft ist sie ohne Einfluß.

Analytische Belege.

Versuch 1.

Frischer, in der früher beschriebenen Weise aus Hundemuskeln gewonnener Preßsaft, wurde zum Teile mit dem gleichen Volumen 2%iger Salzsäure und 5%igen Sublimats nach Schenck gefällt. Je 50 ccm des entquecksilberten und vom Schwefelwasserstoff befreiten Filtrats, entsprechend 50 : 3 ccm Preßsaft wurden mit Schwefelsäure und Salpetersäure nach Neumann verascht. Die Phosphorbestimmungen nach Neumann ergaben:

Best. 1: $n/2$ -NaOH gebunden: 50,75 ccm = 0,533% H_3PO_4
(berechnet auf 100 ccm Vollpreßsaft).

Best. 2: $n/2$ -NaOH gebunden: 51,6 ccm = 0,542% H_3PO_4 .
Mittel: 0,537% H_3PO_4 .

Von demselben Preßsaft wurden zweimal je 20 ccm Vollpreßsaft ebenso nach Neumann verascht und zur Bestimmung der Gesamtphosphorsäure verwendet:

Best. 1: $n/2$ -NaOH gebunden: 61,6 ccm = 0,539% H_3PO_4 .

Best. 2: $n/2$ -NaOH gebunden: 61,1 ccm = 0,535% H_3PO_4 .
Mittel: 0,537% H_3PO_4 .

Versuch 2.

Bei einer Wiederholung von Vers. 1, wobei der Molybdatniederschlag in bekannter Weise in Ammoniummagnesiumphosphat übergeführt wurde, und schließlich als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung gelangte, wurden gefunden in 60 ccm Schenckfiltrat (entsprechend 20 ccm Preßsaft):

Best. 1: gewogenes $Mg_2P_2O_7$: 0,1266 g = 0,557 % H_3PO_4 .

Best. 2: gewogenes $Mg_2P_2O_7$: 0,1273 g = 0,560 % H_3PO_4 .

Mittel: 0,559 % H_3PO_4 .

In 20 ccm Vollpreßsaft wurden gefunden:

Best. 1: $Mg_2P_2O_7$: 0,1342 g = 0,591 % H_3PO_4 .

Best. 2: $Mg_2P_2O_7$: 0,1310 g = 0,577 % H_3PO_4 .

Mittel: 0,584 % H_3PO_4 .

Versuch 3.

Je zweimal 15 ccm von der schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeit eines aus frischem Preßsaft gewonnenen Baryumniederschlags nach Neumann zur Gesamtphosphorbestimmung verascht ergaben:

Best. 1: $n/2$ -NaOH gebunden: 50,2 ccm

Best. 2: $n/2$ -NaOH gebunden: 50,0 ccm

Mittel: 50,1 ccm = 0,585 % H_3PO_4 .

Zweimal 15 ccm zur Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure ergaben:

Best. 1: $Mg_2P_2O_7$: 0,0476 g

Best. 2: » 0,0462 g

Mittel: 0,0469 g = 0,275 % H_3PO_4 .

Versuch 4.

Von der schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeit eines einmal umgefällten Barytniederschlags wurden 10 ccm mit Magnesiainmixtur gefällt. Der mit 2 % igem Ammoniak gründlich gewaschene Niederschlag wird nach Neumann verascht und zur Gesamtphosphorbestimmung benutzt:

$n/2$ -NaOH gebunden: 24,4 ccm = 0,427 % H_3PO_4 .

Filtrat und Waschwasser, ebenfalls zur Gesamtphosphorbestimmung verwandt, ergaben:

$n/2$ -NaOH gebunden: 33,9 ccm = 0,593 % H_3PO_4 .

Versuch 5.

5 ccm der schwefelsauren Zersetzung einer gutgewaschenen Barytfällung, die aus Schenckfiltrat von frischem Hundemuskelpreßsaft gewonnen war, wurden mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. In je 20 ccm wurden Gesamtphosphor und anorganische Phosphorsäure bestimmt:

1. Gesamtphosphor (nach der Fällung der Phosphorsäure nach Neumann wurde der Molybdatniederschlag in verdünntem Ammoniak gelöst, und in bekannter Weise in NH_4MgPO_4 übergeführt, und dieses als $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ gewogen):

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,0652 \text{ g} = 2,870 \% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

2. Anorganischer Phosphor:

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,0206 \text{ g} = 0,905 \% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

Versuch 6.

In 5 ccm der schwefelsauren Zersetzung einer aus zerkleinertem Hundefleisch gewonnenen Barytfällung wurden gefunden:

1. Gesamtphosphor:

$$\text{Gebunden } n/2\text{-NaOH: } 88,4 \text{ ccm} = 3,094 \% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

2. Anorganischer Phosphor:

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,1246 \text{ g} = 2,1940 \% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

Versuch 7.

In je 5 ccm der schwefelsauren Zersetzung einer aus zerkleinertem Pferdefleisch gewonnenen Barytfällung wurden gefunden:

1. Gesamtphosphor:

$$\text{Gebunden } n/2\text{-NaOH: } 82,8 \text{ ccm} = 2,898 \% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

2. Anorganischer Phosphor:

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,1128 \text{ g} = 1,966 \% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

Versuch 24.

Es wurden gefunden in je 5 ccm der schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeiten von Barytfällungen:

A. (Sofort nach Schenck gefällter Preßsaft):

1. Gesamtphosphor:

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,1387 \text{ g} = 2,442\% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

2. Anorganischer Phosphor:

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,0726 \text{ g} = 1,278\% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

B. (Nach zweistündigem Stehen bei 40° nach Schenck gefällter Preßsaft):

1. Gesamtphosphor:

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,1384 \text{ g} = 2,438\% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

2. Anorganischer Phosphor:

$$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7: 0,1022 \text{ g} = 1,800\% \text{ H}_3\text{PO}_4.$$

