

# **Ueber Isokreatinin, eine neue stickstoffhaltige Verbindung im Fischfleisch.**

Von

**Jörgen Eitzen Thesen**, Christiania.

Oberstabsarzt der königlichen norwegischen Armee.

(Der Redaction zugegangen am 30. Juli 1897.)

Es ist durch eine Reihe von Arbeiten, besonders durch die Untersuchungen von Krukenberg und Wagner<sup>1)</sup>, dargelegt worden, dass bezüglich der Extractivstoffe der Muskulatur bei den verschiedenen Thieren grosse Verschiedenheiten herrschen, selbst bei nahe verwandten Thieren. Einzelne dieser Unterschiede sind aber noch wenig oder gar nicht bekannt. Seit einem Jahre habe ich von diesen Gesichtspunkten aus das alkoholische Extract des Fleisches von dem gewöhnlichen Dorsch (*Gadus Morrhua*) untersucht und sehr bald gefunden, dass eine grössere Menge von diesem Extract aus einer kreatininähnlichen Verbindung besteht, welcher ich den Namen Isokreatinin gegeben habe. Von diesem neuen Bestandtheil des Muskels möchte ich hier eine kurze Beschreibung geben.

Als ein bequemes und concentrirtes Ausgangsmaterial habe ich das Fischmehl des Herrn Professor Waage benutzt. Dieses Fischmehl besteht aus dem reinen Fleische des Lofordorsches (Kabeljau) und ist so schnell und bei so niedriger Temperatur getrocknet, dass Körper, wie der von mir zu beschreibende, durch die Präparation keine Umwandlung erlitten haben können. Doch habe ich das Isokreatinin, um sicher zu sein, auch aus dem frischen Fleische des Dorsches hergestellt.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biologie B. 21. p. 25.

### Darstellung des Isokreatinins.

4 kg. Fischmehl werden am besten Morgens mit 40 Liter Wasser von 40°C. in grossen Glaseylindern angesetzt, gut gemischt und in ein stark geheiztes Zimmer gebracht. Um die Fäulnis zu verhüten, setzt man ein wenig Chloroform zu. Im Laufe des Tages rührt man es halbstündlich oder stündlich um, vom Abend ab aber lässt man es sich absetzen und den nächsten Morgen kann man den grössten Theil des Wasserextracts beinahe klar abheben.

Die Cylinder werden wieder mit lauwarmem Wasser gefüllt und die Mischung ein zweites Mal in der gleichen Weise behandelt. Eine dritte Extraction ist nicht lohnend.

Die gesammelten wässrigen Auszüge werden über offenem Feuer in gewöhnlichen emaillirten Kochtöpfen mehrere Stunden gekocht, bis sie auf ungefähr die Hälfte des Volumens eingeengt sind. Das gelöste Eiweiss wird hart coagulirt und lässt sich meistens mit einem Löffel abnehmen. Der Rest wird abfiltrirt. Nach dieser Filtration wird weiter eingedampft, bis die Salze anfangen, sich abzuschneiden. Um die letzten Reste des Fischmehls auszuziehen, wird dieses auch in einen Kochtopf gebracht und mehrere Stunden mit Wasser gekocht, die Flüssigkeit durch Leinen colirt und hierauf filtrirt. Das Filtrat wird zu den übrigen wässrigen Auszügen hinzugefügt. Die bis zur beginnenden Salzabscheidung eingeengten wässrigen Extracte (1 1/2 l. Extract entspricht dann ungefähr 1 kg. Fischmehl) werden jetzt in einen grossen Glaseylinder gegossen und mit ungefähr demselben Volumen concentrirten Alkohols versetzt.

Es bildet sich dann eine reichliche Menge voluminösen Bodensatzes, welcher hauptsächlich aus Leim und anorganischen Salzen besteht, und welchen man einige Stunden zum Absetzen stehen lässt. Dann wird er filtrirt und aller Alkohol abdestillirt, der Rückstand auf dem Wasserbade bis zur dick sirupösen Consistenz eingedampft. Schon bei der Abkühlung kann man oft die Ausscheidung gelber Krystalle von Isokreatinin bemerken. Die sirupöse Masse wird in einen grossen Kolben gebracht und am Rückflusskühler mit Alkohol gekocht. Nach ca. 20 Minuten

wird der alkoholische Extract abgegossen, von Neuem Alkohol zugesetzt und wieder in derselben Weise gekocht. Die Extraction wiederholt man, so lange man eine erhebliche Menge in Lösung gehen sieht. Die alkoholischen Extracte werden filtrirt und auf kleine Volumina eingeeengt. Der Rückstand bildet bei Abkühlung einen Krystallbrei. Diese rohen Krystalle von Isokreatinin werden auf einer Saugplatte vollständig von der sirupösen Mutterlauge abgesaugt und einige Male mit kaltem Alkohol gewaschen. Die Mutterlauge und der Waschkohol werden eingedampft und geben wieder bei Abkühlung reichliche Krystallmengen. Diese Behandlung der Mutterlauge wird noch mehrmals wiederholt, bis sie einen dunkelbraunen Sirup, der gar keine Krystalle enthält, bildet. Die vereinigten Krystallmassen werden in wenig siedendem Wasser gelöst, die Lösung filtrirt und mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Bei der Abkühlung krystallisirt eine reichliche Menge von kleinen, feinen, glänzenden, gelben Blättern aus. Die Krystalle werden auf ein Saugfilter gebracht und mit Alkohol gewaschen. Die Mutterlauge und der Waschkohol werden eingedampft und mit Alkohol versetzt. Sie geben eine zweite Krystallisation. Auch die zweite Mutterlauge gibt nach dem Eindampfen auf Alkoholzusatz eine nicht unbedeutende Krystallabscheidung.

Die auf diese Weise erhaltenen Krystalle werden mehrmals aus concentrirtem, siedendem Alkohol umkrystallisirt und zuletzt in siedendem Wasser gelöst, der Lösung wird Alkohol zugesetzt und bei der Abkühlung krystallisirt das völlig reine Isokreatinin heraus.

Um zu zeigen, dass das Isokreatinin kein Kunstprodukt ist, welches der Herstellung des Fischmehls seinen Ursprung verdankt, und um zugleich ein Urtheil über die Menge des Isokreatinins in den frischen Muskeln zu bekommen, habe ich, wie schon bemerkt, den Körper auch aus frischem Fischfleisch hergestellt. Von zwei grossen Dorschen, die zusammen ein Gewicht von ungefähr 10 kg. hatten, wurden  $4\frac{1}{2}$  kg. reines Muskelfleisch präparirt und in ganz derselben Weise, wie oben beschrieben, behandelt. Die Ausbeute von reinem Isokreatinin war 4.25 gr. oder sehr nahe 1 gr. Isokreatinin für 1 kg. Fisch-

fleisch. Die wirkliche Menge des Isokreatinins ist aber gewiss viel grösser, da ohne Zweifel viel bei der Darstellung verloren geht (speciell in den ersten Mutterlaugen). Die Darstellung aus dem Fischfleisch ist in jeder Beziehung ebenso einfach als die des Fischmehls.

### Beschreibung des Isokreatinins.

Aus siedendem concentrirten Alkohol krystallisirt, ist das Isokreatinin ein feines gelbes Pulver, von fast mikroskopischen nadelförmigen Krystallen. Lässt man die alkoholische Lösung bei gewöhnlicher Temperatur krystallisiren, so werden die Nadeln etwas grösser, doch kaum mehr als 1—2 mm. Aus verdünntem Alkohol (ca. 50%) krystallisirt das Isokreatinin in schönen glänzenden gelben Blättchen, die unter dem Mikroskop sich als rechtwinklige Tafeln erweisen.

Aus siedendem Wasser erhält man es in etwas grösseren Tafeln. Isokreatinin schmeckt ziemlich stark bitter mit unangenehmem Nachgeschmack.

Beim Erhitzen bleibt Isokreatinin zunächst unverändert und verliert nichts an Gewicht bis über 200° C. Bei 230—240° C. zersetzt es sich, doch ohne zu schmelzen, und bei weiterem Erhitzen verbrennt es.

Eine wässrige Lösung von Isokreatinin zeigt in einem Polarisationsapparat bei homogenem Natriumlicht keine Drehung der Polarisationsebene. Das Isokreatinin scheint also optisch inactiv zu sein.

### Analysen.

Kohlenstoff und Wasserstoff sind durch Verbrennung mit Kupferoxyd mit vorgelegter reducirter Kupferspirale bestimmt worden. Die Stickstoffbestimmungen sind volumetrisch ausgeführt worden. Schwefel, Phosphor oder Halogene sind im Isokreatinin nicht nachweisbar.

1. 0.1912 gr. Substanz gibt  
0.2988 gr.  $\text{CO}_2$  = 42.62% C,  
0.1080 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 6.31% H.

- II. 0.2114 gr. Substanz gibt  
 0.3312 gr.  $\text{CO}_2$  = 42.72% C.  
 0.1196 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 6.28% H.
- III. 0.1750 gr. Substanz gibt  
 0.2730 gr.  $\text{CO}_2$  = 42.54% C.  
 0.0960 gr.  $\text{H}_2\text{O}$  = 6.09% H.
- IV. 0.1170 gr. Substanz gibt  
 34.5 ccm. N (zu 0° C. um 760 mm. Barometerhöhe reduziert)  
 = 37.09% N.
- V. 0.1285 gr. Substanz gibt  
 38.2 ccm. N (corr) = 37.34% N.
- VI. 0.1476 gr. Substanz gibt  
 42.8 ccm. N (corr) = 36.71% N.

### Das Molekulargewicht.

Die Molekulargewichtsbestimmungen sind nach dem Princip von Raoult nach der Gefriermethode ausgeführt worden.

I. In 23.2 gr. Wasser bedingt 0.124 gr. Substanz eine Gefrierpunkt-erniedrigung von 0.095° C.  $M = 107$ .

0.316 gr. Substanz eine Gefrierpunkterniedrigung von 0.246° C.  
 $M = 108$ .

0.531 gr. Substanz eine Erniedrigung von 0.396° C.  $M = 112$ .

II. In 20 gr. Wasser bedingt 0.102 gr. Substanz eine Erniedrigung von 0.096° C.  $M = 108$ .

Die einzigste mögliche Formel ist darum  $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$ .

Die Verbindung ist mit Kreatinin isomer.

Nr.	C%	H%	N%	O%	M
I	42.62	6.31			
II	42.72	6.28			
III	42.54	6.09			
IV			37.09		
V			37.34		
VI			36.71		
VII					107
VIII					108
IX					112
X					108
Mittel	42.64	6.23	37.02	14.11	109
Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$	42.48	6.19	37.17	14.16	113

### Löslichkeitsverhältnisse.

Eine grössere Menge Isokreatinin wurde in kochendem Wasser gelöst: nach 24-stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur hatten sich reichliche Mengen Krystalle gebildet. Die klare Lösung wurde abgossen und gewogen: das Wasser verdampft und der Rückstand getrocknet und gewogen:

- I. 5,15 gr. Lösung bei 12° C. gesättigt enthält 0,95 gr. Isokreatinin. Löslichkeit also 0,95 : 4,2 oder 1 : 4,4.
- II. 3,80 gr. Lösung bei 13° C. gesättigt enthält 0,73 gr. Isokreatinin. Löslichkeit also 0,73 : 3,07 oder 1 : 4,2.

Um die Löslichkeitsverhältnisse in kochendem absoluten Alkohol zu bestimmen, wurde Isokreatinin eine halbe Stunde mit einer zur Lösung nicht ausreichenden Menge absoluten Alkohols am Rückflusskühler gekocht und die Lösung sodann durch einen Heisswassertrichter filtrirt. Von dem Filtrat wurde ein Theil zur Bestimmung der Löslichkeit in siedendem Alkohol abgewogen: einen anderen Theil liess ich 24 Stunden zur Bestimmung der Löslichkeit in kaltem Alkohol stehen:

- I. 20,9 gr. siedende Lösung enthält 0,24 gr. Isokreatinin. Löslichkeit also 0,24 : 19,85 oder 1 : 82,8.
- II. 19,01 gr. gesättigte kalte Lösung enthält 0,06 gr. Substanz. Löslichkeit also 0,06 : 18,95 oder 1 : 316.

In Methylalkohol ist Isokreatinin etwas löslicher als in Aethylalkohol. In Aether, Aceton, Chloroform, Petroläther und Benzol ist dagegen das Isokreatinin fast unlöslich.

### Verbindungen mit Säuren.

Das Isokreatinin reagirt deutlich alkalisch und bildet mit Säuren wohl charakterisirte Salze.

Salzsaures Isokreatinin  $C_4H_7N_3O, HCl$  wird auf Zusatz von concentrirter Salzsäure bis zur stark sauren Reaction zu einer concentrirten alkoholischen Lösung von Isokreatinin nach vorsichtigem Eindampfen bis auf ein Viertel des Volumens gewonnen. Das salzsaure Isokreatinin krystallisirt dann bei Abkühlung in schönen, oft federartig angeordneten Nadeln aus. Es ist in Alkohol sehr leicht löslich und wird am besten durch

mehrmaliges Umkrystallisiren aus siedendem Alkohol gereinigt. Es bildet dann schmutziggelbe, oft ziemlich lange Nadeln.

I. 0,149 gr. Substanz zeigt beim Erhitzen auf  $110^{\circ}$  C. keinen Gewichtsverlust. Mit  $\text{Ag NO}_3$  versetzt gibt es 0,1445 gr.  $\text{AgCl}$  = 23,65 % Cl.

II. 0,2038 gr. Substanz gibt  
0,1839 gr.  $\text{AgCl}$  = 23,08 % Cl.

Im Mittel gefunden

Cl = 23,36 %

Berechnet für die Formel

$\text{C}_4\text{H}_7\text{H}_3\text{O}_2\text{HCl}$

Cl = 23,21 %.

Schwefelsaures Isokreatinin  $(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O})_2\text{H}_2\text{SO}_4$ . Wird concentrirte Schwefelsäure zu einer concentrirten kochenden alkoholischen Lösung von Isokreatinin gesetzt, entsteht bald eine Trübung, und beim Abkühlen scheiden sich reichliche, ziemlich grosse spitze Krystallnadeln aus. Diese sind in Alkohol fast unlöslich, im Wasser dagegen sehr leicht löslich. Umkrystallisirt werden sie am besten durch Lösen in etwas Wasser, Versetzen der Lösung mit Alkohol und vorsichtigen allmählichen Zusatz von Aether. Das schwefelsaure Isokreatinin wird dann in schmalen, oft sternförmig angeordneten, bis centimeterlangen Blättern gewonnen, welche schwach gelblich, durchsichtig und so spröde sind, dass sie nicht ohne Schwierigkeiten aus dem Krystallisationsgefäss entfernt werden können.

I. 0,1030 gr. Substanz gibt

$\text{Ba SO}_4$  0,0760 gr. = 31,03 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$

II. 0,1982 gr. Substanz gibt

$\text{Ba SO}_4$  0,145 gr. = 30,77 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Im Mittel gefunden

$\text{H}_2\text{SO}_4$  = 30,90 %

Berechnet für die Formel

$(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O})_2\text{H}_2\text{SO}_4$

$\text{H}_2\text{SO}_4$  = 31,21 %.

Saures oxalsaures Isokreatinin  $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}, \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ . Wenn eine kochende, gesättigte, alkoholische Lösung von Isokreatinin mit einer starken siedenden alkoholischen Lösung von Oxalsäure bis zur deutlich sauren Reaction versetzt wird, entsteht sogleich eine Trübung und beim Abkühlen krystallisirt das saure oxalsaure Isokreatinin in oft centimeterlangen, feinen, wohlausgebildeten, spitzen, schwachgelben Nadeln aus. Das Oxalat ist in Alkohol sehr schwer löslich und wird wie das

Sulfat am besten durch Lösung in Wasser und Zusatz von Alkohol und Aether gereinigt. So schöne Krystalle wie die ursprünglichen erhält man indess nach dem Umkrystallisiren nicht wieder.

- I. 0,2350 gr. Substanz gibt bei Verbrennung  
 0,0914 gr.  $H_2O$  = 4,32 % H  
 0,3060 gr.  $CO_2$  = 35,59 % C.  
 II. 0,1785 gr. Substanz gibt  
 29,30 ccm N (corr) = 20,62 % N.  
 III. 0,1665 gr. Substanz gibt  
 27,1 ccm N (corr) = 20,44 % N.

Gefunden	Berechnet für den Formel
C = 35,57 %	$C_4H_7N_3O \cdot C_2H_2O_4$
H = 4,32	C = 35,42
N = 20,35 (im Mittel)	H = 4,43
O = 39,64	N = 20,69
	O = 39,46

### Verbindungen des Isokreatinins mit Metallsalzen.

Mit Metallsalzen bildet Isokreatinin Doppelverbindungen, von welchen hier einige besprochen werden mögen.

Isokreatinincadmiumchlorid  $C_4H_7N_3O \cdot CdCl_2$ . Wird einer concentrirten, alkoholischen, kochenden Lösung von Isokreatinin eine starke Lösung von reinem Cadmiumchlorid zugesetzt, so entsteht alsbald eine Trübung und beim Abkühlen bilden sich reichliche, feine Krystallnadelchen. Diese sind in kaltem Wasser nicht leicht löslich, in siedendem viel leichter, und sie können somit aus siedendem Wasser leicht umkrystallisirt werden. In concentrirtem Alkohol sind sie sehr schwer löslich.

I. 0,1361 gr. Substanz verliert bei Trocknung in  $100^\circ C$ . nichts an Gewicht. In Wasser gelöst wird es mit Schwefelwasserstoff gefällt. Das gebildete Schwefelcadmium auf einem trockenen, gewogenen Filter abfiltrirt, mit Alkohol, Aether und Schwefelkohlendensäure gewaschen, gibt  
 0,0658 gr.  $CdS$ . = 0,0512 gr. Cadmium = 37,65 % Cd.

II. 0,1955 gr. Substanz wurde zur Chlorberechnung verwendet und gab 0,1878 gr.  $AgCl$  = 0,0465 gr. Cl = 23,80 % Cl.

Gefunden	Berechnet für die Formel
Cd = 37,65 %	$C_4H_7N_3O \cdot CdCl_2$
Cl = 23,80 %	Cd = 37,84 %
	Cl = 23,99 %



Isokreatininchlorzink  $C_4H_7N_3O \cdot ZnCl_2$ . Wird einer concentrirten, kochenden, alkoholischen Lösung von Isokreatinin eine starke neutrale Lösung von Chlorzink zugesetzt, so bildet sich nach einer Weile ein Bodensatz von feinen Krystallnadeln.

Diese Nadeln sind schwer löslich in Wasser und sehr schwer löslich in Alkohol. Sie werden am besten durch Lösen in Wasser und Zusatz von Alkohol umkrystallisirt.

I. 0,2345 gr. Substanz verliert beim Trocknen bei  $110^\circ C$ . nichts an Gewicht. Es gibt 0,0908 gr.  $ZnS$  = 0,0608 gr.  $Zn$  = 25,92%  $Zn$ .

II. 0,2175 gr. gibt 0,2492 gr.  $AgCl$  = 0,0616 gr.  $Cl$  = 28,35%  $Cl$ .

Gefunden

$Zn$  = 25,92%

$Cl$  = 28,35%

Berechnet für die Formel

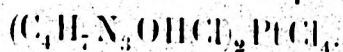
$C_4H_7N_3O \cdot ZnCl_2$

$Zn$  = 26,10%

$Cl$  = 28,54%

Mit Sublimat bildet Isokreatinin einen amorphen Bodensatz, den ich nicht zur Krystallisation bringen konnte. Diese Verbindung ist schwer löslich in Wasser und sehr schwer löslich, jedoch nicht unlöslich in Alkohol. Analysen von dem amorphen Bodensatz haben nicht zu einer bestimmten Formel geführt.

#### Salzsaures Isokreatininplatinchlorid



Wenn salzsaurem Isokreatinin, in warmem Alkohol gelöst, eine starke Lösung von Platinechlorid zugesetzt wird, so bilden sich alsbald reichliche Mengen von starkgelben Krystallnadelchen. Sie sind in concentrirtem Alkohol sehr schwer löslich, in verdünntem siedenden Alkohol aber ziemlich leicht löslich. Aus dieser Lösung krystallisirt es bei Abkühlung als stark rosafarbige Krystallmasse aus. Werden diese rothen Nadeln bei  $110^\circ C$ . getrocknet, so verlieren sie an Gewicht und werden gelb, wie die aus concentrirtem Alkohol gewonnenen Krystalle.

I. 0,0965 gr. der rothen Nadeln über Schwefelsäure getrocknet verlieren bei Trocknung bei  $110^\circ C$ . 0,0050 gr. an Gewicht = 5,18%  $H_2O$ .

II. 0,1640 gr. gelbe Nadeln bei  $110^\circ$  getrocknet geben nach dem Glühen 0,0495 gr.  $Pt$  = 30,18%  $Pt$ .

Gefunden

$H_2O$  = 5,18%

$Pt$  = 30,18%

Berechnet für die Formel

$(C_4H_7N_3O)_2PtCl_4 + 2H_2O$

$H_2O$  = 5,40%

Für die Formel:

$(C_4H_7N_3O)_2PtCl_4$

$Pt$  = 30,16%

### Weitere Eigenschaften des Isokreatinins.

1. Mit einer alkalischen Lösung von Kupfersulfat gibt Isokreatinin eine stark blaue Farbe, und beim Erhitzen auf ca. 80° C. entsteht ein sehr reichlicher Bodensatz, der im Anfang einen Moment als gelbes Kupferoxydul erscheint, bald aber in eine braunschwarze Menge übergeht, die eine Mischung von Kupferoxyd und Kupferoxydul darzustellen scheint.
2. Mit Kupfersulfat und einem Reductionsmittel (z. B. unterschwefelsaurem Natron) gibt Isokreatinin nach kurzem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur einen hellgrünen Niederschlag. Beim Stehen unter Luftzutritt oder schneller beim Erhitzen wandelt sich dieser Bodensatz aber zu derselben braunschwarzen Mischung um, die bei Erhitzung mit alkalischem Kupfersulfat gebildet wird.
3. Beim Erhitzen reducirt Isokreatinin leicht frisch dargestelltes Quecksilberoxyd.
4. Mit Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure gibt Isokreatinin einen voluminösen Niederschlag.
5. Durch Kaliumquecksilberjodid oder Kaliumcadmiumjodid wird Isokreatinin nicht gefällt, auch nicht durch Gerbsäure, Bleiacetat oder Kupferacetat.
6. Mit salpetersaurem Silber gibt es keinen Niederschlag, weder in neutraler noch in saurer Lösung.
7. Mit Pikrinsäure gibt Isokreatinin keinen Niederschlag, selbst nicht in concentrirter, alkoholischer Lösung.
8. Isokreatinin gibt keine Biuretreaction, auch nicht nach dem Erhitzen.
9. Murexidreaction gibt es nicht.
10. Eine wässrige Lösung von Isokreatinin gibt mit Pikrinsäure und einigen Tropfen verdünnter Natronlauge eine starke rothe Färbung (Jaffé's Kreatininreaction).
11. Mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge gibt Isokreatinin eine rothe Farbe (Weyl's Reaction). Diese Reaction entsteht aber mit Isokreatinin erst nach einer Weile und auch nicht in so verdünnten Lösungen, wie dies beim Kreatinin der Fall ist. Setzt man der rothen Flüssigkeit Essigsäure zu und erhitzt, so färbt sie sich blau (Salkowsky's Reaction).

12. Eine blassgelbe Eisenchloridlösung wird von Isokreatinin stark gelb gefärbt. Beim Erhitzen wird sie roth und es entsteht ein rother Niederschlag.

### Einwirkung der Kalkmilch auf Isokreatinin.

0.5 gr. Isokreatinin wurden in einen Kolben mit reichlichen Mengen Kalkmilch gebracht und 10 Tage bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Dann wurden reichliche Mengen siedendes Wasser zugesetzt und warm filtrirt. In das Filtrat wurde Kohlensäure geleitet und der gebildete kohlensaure Kalk abfiltrirt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, der Rückstand in siedendem Wasser gelöst, filtrirt und mit der 3- oder 4fachen Menge Alkohol versetzt. Nach 48 Stunden waren am Boden und an den Wänden des Gefäßes ziemlich reichliche Mengen von festsitzenden, harten, farblosen Krystallen gebildet. Unter dem Mikroskope erwiesen sich diese Krystalle deutlich als Prismen. Mit denselben wurden folgende Versuche angestellt:

1. 0,1096 gr. Krystalle, bei 50° getrocknet, verlieren beim Trocknen bei 100° C. an Gewicht 0,0130 gr. = 12,05 %.

(Berechnet für  $C_4H_9N_3O_2 + H_2O$  ist  $H_2O = 12,08\%$ .)

2. Wird einer concentrirten wässrigen Lösung der Krystalle bei 50° C. eine concentrirte Lösung von Cadmiumchlorid zugesetzt und langsam abgekühlt, so entsteht ein krystallinischer Bodensatz.

3. Ein Theil von den Krystallen wurde 20 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt und dann in ein Becherglas mit vielem Wasser gebracht. Zu einem Theil der so entstehenden stark verdünnten wässrigen Lösung wurden reichliche Mengen von essigsauerm Natron und sehr wenig Zinkchlorid zugesetzt. Alsbald entstand ein deutlicher Niederschlag, der sich unter dem Mikroskop deutlich krystallinisch zeigte.

Die bei Behandlung von Isokreatinin mit Kalkmilch gewonnenen Krystalle scheinen hiernach mit Kreatin identisch zu sein.

### Behandlung mit übermangansaurem Kali.

Eine Lösung von 1 gr. Isokreatinin in 400 cem. Wasser wird bis zur Wasserbadtemperatur erhitzt und mit einer 1/2% Lösung von übermangansaurem Kali, solange sich dies noch entfärbt, versetzt. Hierzu ist ca. 40 cgr. übermangansaures

Kali nöthig. Der Niederschlag wird filtrirt und das klare, schwach alkalische Filtrat auf dem Wasserbad eingedampft. Bei diesem Eindampfen entweichen reichliche Mengen Ammoniakdämpfe. Der Rückstand bildet jetzt ein gelbweisses Pulver, welches mit kochendem Alkohol behandelt wird. Durch diese Behandlung löst sich ein Theil des Rückstandes auf, ein anderer Theil bleibt ungelöst zurück. Der in Alkohol unlösliche Theil löst sich im Wasser leicht auf und krystallisirt bei langsamer Verdunstung des Wassers in hübschen Krystallen aus, die sich als beinahe reines oxalsaures Kali erweisen. Die alkoholische Lösung ist stark gelb und enthält eine Mischung von Verbindungen, die ich nicht zu identificiren vermochte. Oxalsäure oder Methylguanidin lassen sich nicht nachweisen.

#### Behandlung mit Baryumhydroxyd.

0,3 gr. Isokreatinin wird mit grossem Ueberschuss von Baryumhydroxyd am Rückflusskühler gekocht. Um das eventuell entweichende Ammoniak aufzufangen, wird das Kühlrohr mit einem Will-Varrentrapschen Kühlapparat und einem U-Rohre, in welchem sich eine abgemessene Menge  $\frac{1}{10}$  normale Schwefelsäure befindet, in Verbindung gesetzt. Nach 2tägigem Kochen wird der Kühler niedergebogen und der grösste Theil des Wassers abdestillirt und in  $\frac{1}{10}$  normale Schwefelsäure aufgefangen. Dieses Destillat wird mit dem Inhalt vom Will-Varrentrapschen Rohre und U-Rohre zusammengebracht und mit  $\frac{1}{10}$  normalem NaHO titirt. Es ergab sich, dass 17,72% N abgespalten waren. (In zwei anderen Bestimmungen, die auf dieselbe Weise ausgeführt waren, wo die Mischung aber nur 9 und 12 Stunden gekocht war, hatten sich 15,6 und 16,8% N abgespalten.) Da die Substanz 37,17% N oder 3 Atome N in seinem Molekül enthält, so ist in allen 3 Bestimmungen mehr als 1 und weniger als 2 Atome von Stickstoff abgespalten. Die stattgehabte Umsetzung kann also kein glatter Process sein.

Nach der Destillation wird dem Rückstand viel warmes Wasser zugesetzt und sodann filtrirt. Auf dem Filter bleibt eine reichliche, im Wasser unlösliche salzartige Masse zurück.

die sich aber leicht in Salzsäure unter Entwicklung von reichlichen Mengen  $\text{CO}_2$  auflöste. Bei Zusatz von Kalkwasser zu dieser salzsauren Lösung entsteht ein deutlicher Niederschlag, wahrscheinlich von oxalsaurem Kalk.

Der im Wasser lösliche Theil des Rückstandes wurde erhitzt und Kohlensäure zugeleitet, wodurch ein reichlicher Bodensatz von kohlensaurem Baryt entstand. Dieser wurde abfiltrirt und weiterhin Kohlensäure hindurchgeleitet, bis sich aus der heissen Lösung kein Niederschlag mehr abschied. Die klare Flüssigkeit wurde sodann über dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand war ein gelbbrauner Sirup, der mehrere Tage in das Vacuum über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestellt wurde, ohne Anzeichen einer Krystallisation zu geben. Er wurde sodann in Wasser aufgelöst und noch mehr mit Kohlensäure behandelt; ein Niederschlag bildete sich diesmal nicht einmal spurweise. Auf Zusatz von Schwefelsäure entstand aber ein ziemlich reichlicher Niederschlag von schwefelsaurem Baryt, der unter Vermeidung eines Ueberschusses von Schwefelsäure vorsichtig ausgefällt und dann abfiltrirt wurde. Das Filtrat wurde sodann eingedampft und bildete wieder einen Sirup, den ich nicht zur Krystallisation bringen konnte, selbst nicht nach längerem Stehen im Vacuum über Schwefelsäure.

#### **Erhitzen mit concentrirter Schwefelsäure.**

Eigenthümlich ist die Widerstandsfähigkeit des Isokreatinins bei Behandlung mit Schwefelsäure. Um den Stickstoff zu bestimmen, wurden in einem Kjehldahl-Kolben dem Isokreatinin reichliche Mengen concentrirter Schwefelsäure, die 10% Phosphorsäureanhydrid enthielt, zugesetzt, aber es trat keine Spur von Verkohlung ein. Selbst beim Kochen blieb die Flüssigkeit ganz unverändert. Und als ich nun nach mehrstündigem Kochen die Flüssigkeit in einen Destillationskolben brachte und ihr einen Ueberschuss von Natronlauge zusetzte, zeigten sich nur geringe Spuren von Ammoniak im Destillat.

Ein anderer Theil wurde in derselben Weise mit Schwefelsäure behandelt und 4 Stunden gekocht, worauf das Reactionsprodukt mit vielem Wasser versetzt und mit Baryt neutralisirt

wurde. Der schwefelsaure Baryt wurde wieder abfiltrirt und die Flüssigkeit auf ein ganz kleines Volumen eingedampft, worauf es in beinahe das doppelte Volumen concentrirten Alkohol gegossen wurde. Beim Abkühlen schied sich schwefelsaures Isokreatinin in Krystallen aus.

### Einwirkung des Broms auf Isokreatinin.

Wird trockenes Isokreatinin und trockenes Brom nebeneinander unter eine Glasglocke gestellt, so dass das Isokreatinin der Einwirkung des dampfförmigen Broms ausgesetzt ist, so nimmt es sehr schnell an Gewicht zu (in 24 Stunden bis mehr als 90%) und es bildet sich eine rothe, teigige Masse. Diese Masse riecht stark nach Brom, und wenn sie frei an die Luft gestellt wird, nimmt sie wieder rasch an Gewicht ab, bis eine Gewichtserhöhung von 58–59% resultirt (berechnet für die Dibromverbindung 58,6%). Noch weiterer Gewichtsverlust findet nur langsam statt. Diese Dibromverbindung ist aber sehr labil und es ist mir nicht gelungen, sie zur Krystallisation zu bringen. Wird sie in kaltem Alkohol gelöst und viel Aether zugegossen, so krystallisiren feine, nadelförmige Krystalle aus. Werden diese Nadeln aber in Wasser gelöst, geben sie mit salpetersaurem Silberoxyd einen reichlichen Niederschlag. Zwei verschiedene Brombestimmungen, eine direkt durch Fällung der wässrigen Lösung mit Silbernitrat, die andere nach vorheriger Behandlung mit Natriumamalgam, gaben dasselbe Resultat. Die Krystalle scheinen also ein bromwasserstoffsäures Salz von einer bromfreien Base zu sein. Genauer wurden sie nicht untersucht.

Ausser dem gewöhnlichen Kreatinin, das von Liebig so klassisch beschrieben worden ist, hat Stillingfleet Johnson<sup>1)</sup> zwei Modificationen beschrieben, die er aus dem menschlichen Harn ohne Anwendung der Siedehitze dargestellt hat. Er nennt das eine natürliche Kreatinin oder «efflorescent Kreatinin» und das andere «tabular Kreatinin von Harn». Die beiden Körper wurden dargestellt durch Fällung von Harn mit Sublimat.

<sup>1)</sup> Proceedings of the Royal Society of London, Vol. 43, p. 493.

Zersetzung der Sublimatverbindung mit Schwefelwasserstoff und der Chlorverbindung mit Bleioxyd. Die Krystallisation geht im Vacuum über Schwefelsäure vor. Zuerst krystallisirt dann das natürliche Kreatinin und zwar mit zwei Molekülen Wasser. Die Mutterlange wird bei 60° C. eingedampft und wieder im Vacuum über Schwefelsäure gestellt, und jetzt krystallisirt das <tabular> Kreatinin ohne Wasser. Von dem tafelförmigen Kreatinin wird wieder eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Form beschrieben.

Alle diese Modificationen sind indess untereinander nahe verwandt und werden hauptsächlich durch die Krystallisationsverhältnisse unterschieden. Durch Erhitzen in einer wässrigen Lösung lassen sie sich leicht ineinander überführen.

Von dem gewöhnlichen Liebig'schen Kreatinin sind sie hauptsächlich durch folgende Merkmale unterschieden:

1. Zwei Moleküle <natürliches> Kreatinin reduciren ebenso viel Kupferoxyd als drei Moleküle von Liebig's Kreatinin.
2. <Natürliches> Kreatinin ist in Alkohol bei 17° C. löslich im Verhältniss 1:362, während Liebig's Kreatinin bei 16° C. im Verhältniss 1:102 löslich ist.
3. Im Wasser ist das <natürliche> Kreatinin im Verhältniss 1:10,78 löslich, während Liebig's Kreatinin 11,5 Theile Wasser zur Lösung verlangt.
4. Die Platinchloriddoppelverbindung von <natürlichem> Kreatinin krystallisirt mit zwei Molekülen Wasser und verhält sich ganz wie die analogen, oben beschriebenen Verbindungen von Isokreatinin, während die analogen Verbindungen von Liebig's Kreatinin ohne Wasser krystallisiren.

Das oben beschriebene Isokreatinin vom Fischfleisch unterscheidet sich in mehreren wichtigen Beziehungen nicht nur von Liebig's Kreatinin, sondern auch von Stillingfleet Johnson's Modification. Die hauptsächlichsten Verschiedenheiten sind folgende:

1. Die Farbe. Alle bis jetzt bekannten Formen von Kreatinin sind farblos, während Isokreatinin immer gelb ist.

2. Löslichkeitsverhältnisse. Isokreatinin ist fast dreimal so löslich in kaltem Wasser als Kreatinin (s. o.). In Alkohol ist Isokreatinin löslich im Verhältniss 1:315,9 bei gewöhnlicher Temperatur, während die Löslichkeit von Liebig's Kreatinin 1:102 und die von Stillingfleet Johnson's Präparat 1:260 beträgt.
3. Verbindungen mit Säuren. Isokreatinin bildet ein leichtlösliches Pikrat: während die pikrinsaure Verbindung des Kreatinins fast unlöslich ist, ist für Isokreatinin charakteristisch das in Alkohol fast unlösliche schwefelsaure und das saure oxalsaure Salz.
4. Die oben beschriebenen Metallsalze von Isokreatinin verhalten sich in der Hauptsache ebenso, wie die analogen Verbindungen des Kreatinins. Die durchgehende Verschiedenheit ist die Leichtlöslichkeit des Isokreatinins im Wasser. Speciell sind die Chlorzinkverbindung und die Sublimatverbindung verhältnissmässig leicht löslich. Die Verbindung des Isokreatinins mit Platinchlorid verhält sich ganz wie die analogen Verbindungen von Stillingfleet Johnson's Kreatinin: sie krystallisirt aus concentrirtem Alkohol ohne Wasser, aus verdünntem Alkohol oder aus Wasser mit zwei Molekülen Krystallwasser.
5. Die Farbenreactionen des Kreatinins treten beim Isokreatinin auch ein. Doch entsteht Weyl's Reaction beim Isokreatinin nicht so schnell oder in so grossen Verdünnungen wie beim Kreatinin. Eisenchlorid wird erst beim Erhitzen roth gefärbt.
6. Beim längeren Kochen mit Wasser oder nach mehrwöchentlichem Stehen mit Kalkmilch geht sowohl Liebig's wie Stillingfleet Johnson's Kreatinin in Kreatin über. Isokreatinin ändert sich beim Kochen mit Wasser gar nicht, wohl aber scheinen die oben beschriebenen, durch Behandlung des Isokreatinins mit Kalkmilch erhaltenen Krystalle mit Kreatin identisch zu sein.



7. Bei Behandlung des Kreatinins mit Kaliumpermanganat wird nach Neubauer kein Ammoniak abgespalten, während sich reichliche Mengen Methylguanidin bilden. Isokreatinin gibt mit Permanganat viel Ammoniak, aber kein Methylguanidin.

Aus den oben erwähnten, zahlreichen, bedeutenden Verschiedenheiten zwischen Kreatinin und Isokreatinin darf man wohl schliessen, dass das Molekül des Isokreatinins in vieler Hinsicht von dem des Kreatinins verschieden ist. Da es leider nicht gelungen ist, ein für Isokreatinin charakteristisches Spaltungsprodukt zu isoliren, so kann man auch keine Vermuthung über das Wesen dieser Verschiedenheiten haben. Nur scheint die sonderbare Stabilität des Isokreatinins gegen concentrirte Schwefelsäure darauf zu deuten, dass jedes der Stickstoffatome an ein besonderes Kohlenstoffatom gebunden ist und nicht wie in Kreatinin zwei Gruppen NH zu ein C gehören.

Diese Arbeit ist grösstentheils in dem pharmakologischen, theilweise aber auch in dem chemischen Institut der hiesigen Universität mit freundlicher Erlaubniss der Directoren ausgeführt worden.

Christiania, den 24. Juli 1897.