

Zur Kenntniss der Extractivstoffe der Muskeln.

Von

Wl. Gulewitsch und S. Amiradibi.

Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.)

Der Redaction zugegangen am 13. August 1900.)

Die Muskeln mit ihren zahlreichen Extractivstoffen, deren genaue Kenntniss unsere Vorstellungen von dem Chemismus des Umsatzes der complicirteren Bestandtheile dieser Organe bedeutend zu erweitern im Stande ist, haben schon öfters als Object der chemischen Untersuchungen gedient. Trotz vieler in dieser Richtung ausgeführten Arbeiten kann man aber nicht leugnen, dass unsere Kenntnisse von den Extractivstoffen der Muskeln noch ziemlich dürftige sind und dass die Anwendung neuer Untersuchungsmethoden, manche bis jetzt nicht bekannte Verbindungen darin aufdecken wird. Beträgt doch z. B. der Stickstoffgehalt der aus den Extractivstoffen der Muskeln isolirten chemischen Individuen nur einen Bruchtheil des gesammten Stickstoffgehaltes des Fleischextractes. Da wir somit Gründe hatten, eine Reihe von bis jetzt nicht bekannten stickstoffhaltigen Bestandtheilen darin zu vermuthen, haben wir eine chemische Untersuchung der Muskelextractivstoffe unternommen, die zur Auffindung des Carnosins, einer neuen organischen Base, geführt hat und deren Resultate weiter unten mitgetheilt werden sollen.¹⁾

Für die Untersuchung haben wir 460 g Liebig'sches Fleischextract verwandt, welches in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und mit einer concentrirten Lösung von Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses derselben ausgefällt wurde. Der enorme Niederschlag wurde nach 24 Stunden abgesaugt, ausgewaschen und

¹⁾ Eine vorläufige Mittheilung wurde in den Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1902 veröffentlicht.

durch Zerreiben mit Barythydrat in der Kälte zersetzt. Aus dem Filtrate wurde der überschüssige Baryt durch die Kohlensäure entfernt, das neue Filtrat bis auf 1 Liter eingedampft, mit Salpetersäure neutralisirt und mit Silbernitrat versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltrirt, das Filtrat nach A. Kossel's Verfahren¹⁾ mit der nöthigen Menge Silbernitrat und überschüssigem Barythydrat ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt, ausgewaschen und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die alkalische Flüssigkeit wurde mit Kohlensäure gesättigt, eingedampft, von einem Niederschlage abfiltrirt und mit Salpetersäure neutralisirt. Die auf dem Wasserbade stark concentrirte Flüssigkeit erstarrte nach dem Erkalten strahlig krystallinisch; die Krystalle wurden abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen.

Das erhaltene Nitrat war in Wasser sehr leicht löslich. Da es in Folge dessen durch Umkrystallisiren aus Wasser nicht zu reinigen war, verfahren wir auf folgende Weise: das Salz wurde in wenig Wasser gelöst und die heisse Lösung mit Alkohol bis zur bleibenden Trübung versetzt; beim Stehen über Nacht schieden sich prachtvolle, sternförmige Drusen von zarten, nadelförmigen, durchsichtigen und farblosen Krystallen aus, welche abgesaugt wurden. Das Filtrat davon wurde eingedampft und noch heiss mit absolutem Alkohol bis zur bleibenden Trübung versetzt, wobei noch eine geringe Menge Substanz in denselben Drusen erhalten wurde. Diese Verbindung war das salpetersaure Salz einer noch nicht bekannten organischen Base, die wir Carnosin benannt haben.

Carnosinnitrat. Das Salz, dessen Isolirung aus dem Fleischextracte oben beschrieben ist, wurde aus möglichst wenig heissem Wasser umkrystallisirt, worin das Salz äusserst löslich war. Die sich nach dem Erkalten ausgeschiedene, strahlig krystallinische Substanz wurde abgesaugt, mit verdünntem Alkohol ausgewaschen, über Schwefelsäure getrocknet und zur Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens verwendet.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 179.

Eine wässrige Lösung der Substanz bei $c = 5.67^{\circ}$, $t = 20^{\circ}$ und $l = 200$ mm. zeigte¹⁾ $\alpha = + 2,81$ Theilstriche (100 Theilstriche = 360 Kreisgrade), d. h.

$$[\alpha]_D^{20} = + 22.3^{\circ}.$$

Die polarisirte Lösung wurde stark eingedampft und die Substanz daraus durch Alkoholzusatz auf die oben beschriebene Weise abgeschieden. Das Salz schmolz unter starker Zersetzung bei $211-212^{\circ}$. Die Lösung desselben zeigte eine schwachsaure Reaction auf Lackmuspapier, veränderte aber die Farbe des Congopapiers nicht. Das Salz wurde bei 120° getrocknet, wobei es kein Krystallwasser verlor, und analysirt.

I. 0.2861 g Substanz gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0.3967 g CO_2 und 0.1388 g H_2O .

II. 0.2017 g Substanz lieferten beim Verbrennen mit Bleichromat 0.2791 g CO_2 und 0.0986 g H_2O .

III. Aus 0.2848 g Substanz resultirten 59.95 cem. feuchter N (16 : 751 mm. Bar.).

	Gefunden:			Berechnet für	
	I.	II.	III.	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HNO}_3$	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HNO}_3$
C	37.82 %	37.74 %	—	37.32 %	37.07 %
H	5.44 %	5.48 %	—	5.24 %	5.89 %
N	—	—	24.17 %	24.26 %	24.09 %
O	—	—	—	33.18 %	32.95 %

Die Resultate der Analysen stimmen somit besser mit der Formel $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HNO}_3$ überein.²⁾

Carnosin wurde aus dem Nitrate durch die Fällung desselben mit der Phosphorwolframsäure dargestellt. Der aus dem heissen Wasser umkrystallisirte Niederschlag wurde durch Barythydrat auf die bekannte Weise zersetzt. Das Carnosin ist in Wasser sehr leicht löslich; aus der wässrigen Lösung, die eine starke alkalische Reaction hat, wird es durch Alkohol gefällt. Die Verbindung schmilzt unter starker Zersetzung bei 239° . Das Carnosin krystallisirt in mikroskopischen flachen

1) Die Beleuchtung war etwas ungünstig.

2) Der Kohlenstoffgehalt wurde um etwa 0.4 % höher gefunden, was bei der Verbrennung eines Nitrates trotz der vorgelegten reducirten Kupferspiralen leicht der Fall sein kann.

zugespitzten Nadelchen: die Auslöschungsrichtung ist der langen Kante parallel, welche die Axe der kleineren Elasticität ist.

Saures Carnosinsilbernitrat wurde durch Vermischen von Carnosinnitrat mit einem Ueberschuss von Silbernitrat dargestellt: die zur Syrupdicke eingedampfte Flüssigkeit wurde mit absolutem Alkohol durchgerührt, der ausgeschiedene Niederschlag abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen, um das überschüssige Silbernitrat zu entfernen. Die übrig gebliebene Substanz war in Wasser sehr leicht löslich. Die zum Syrup eingedampfte sauer reagirende Lösung derselben krystallisirte bei längerem Stehen in mikroskopischen langen schiefen oder rhomboidalen Tafeln, deren spitze Winkel häufig abgestumpft waren. Bei der leichten Löslichkeit der Substanz und der geringen Menge derselben konnte sie weiter nicht gereinigt werden.

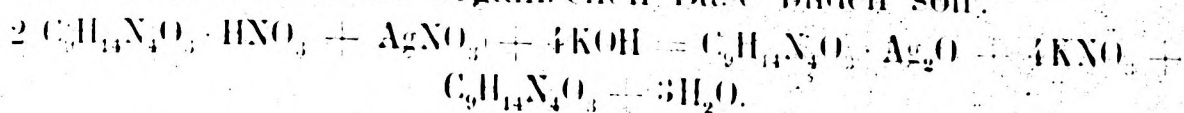
Carnosinsilber. Die mit Wasser verdünnte Lösung von saurem Carnosinsilbernitrat wurde mit $\frac{1}{10}$ N.-Kalilauge bis zur Bildung einer geringen gelborangen Fällung versetzt, die Lösung filtrirt und mit einigen weiteren Cubikcentimeter Kalilauge gemischt, wobei eine schwache rein weisse Trübung entstand. Die schwach alkalisch reagirende Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade stark eingedampft, wobei eine geringe Schwärzung eintrat. Beim Stehen verwandelte sich die Flüssigkeit in eine vollständige durchsichtige Gallerte, in der keine Krystalle unter dem Mikroskop zu bemerken waren. Beim Erwärmen löste sich die Gallerte vollkommen auf und die von einer geringen Menge reducirten Silbers abfiltrirte Flüssigkeit schied nach dem Erkalten und beim Umrühren einen kurz- und feinfaserigen Niederschlag aus, der beim Stehen etwas gallertartig wurde. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen, im Vacuum getrocknet und analysirt.

IV. 0.1306 g Substanz in Wasser unter Zusatz von HNO_3 gelöst und mit HCl gefällt gaben 0.0811 AgCl .

Gefunden:		Berechnet für
IV,		$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Ag}_2\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$:
Ag	46.74 %	47.11 %

Es war somit die erhaltene gallertige Substanz das Carnosinsilber $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Ag}_2\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ resp. $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{Ag}_2\text{O}$, das dem

Argininsilber ($C_6H_{14}N_4O_2 \cdot Ag_2O$)¹⁾ analog zusammengesetzt ist und sich aus dem Doppelsalze mit dem Silbernitrate ebenfalls unter Freiwerden der organischen Base bilden soll:



Wie für die Bildung von Argininsilber, so ist auch für die des Carnosinsilbers die Mitwirkung von einem fixen Alkali nothwendig: setzt man zu einer Lösung von Carnosin- und Silbernitrat Barytwasser oder Kali- resp. Natronlauge, so bekommt man einen voluminösen weissen Niederschlag von Carnosinsilber, dessen Bildung ausbleibt, wenn Ammoniak, selbst äusserst vorsichtig, anstatt des fixen Alkali zugesetzt wird. Das Carnosin verhält sich somit in dieser Hinsicht dem Arginin analog und von dem Histidin verschieden.

Die zwischen dem Carnosin- und dem Argininsilber existirende Analogie wird dadurch noch auffallender, dass auch das Carnosin eine mehr Silber enthaltende Silberbase bilden kann. Als nämlich das Filtrat von dem oben beschriebenen Carnosinsilber mit Wasser verdünnt und mit 1¹⁰ N.-KOH fractionirt und unter gutem Umrühren weiter gefällt wurde, entstanden zwei voluminöse, gallertartige, schneeweisse Niederschläge (Nr. 1 und 2), welche abfiltrirt und mit Wasser, Alkohol und Aether in einem verdunkelten Zimmer sehr sorgfältig ausgewaschen wurden, was viel Zeit in Anspruch genommen hat. Die Niederschläge wurden dann im Vacuum getrocknet und analysirt.

V. 0.1987 g Substanz Nr. 1 gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0.1785 g CO_2 , 0.0581 g H_2O und 0.0958 g Ag.

VI. 0.1866 g Substanz Nr. 2 in Wasser unter Zusatz von HNO_3 gelöst und mit HCl gefällt lieferten 0.1225 g AgCl.

Gefunden:		Berechnet für
	V.	VI.
		$C_9H_{14}Ag_2N_4O_4$:
C	24.50%	—
H	3.28%	—
Ag	48.21%	49.42%

Also enthielten diese zwei Substanzen mehr Kohlenstoff und mehr Silber, als es für die Formel $C_9H_{14}N_4O_3 \cdot Ag_2O$ be-

¹⁾ Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 205.

rechnet ist, da das Carnosin als eine starke Base Kohlensäure aus der Luft anzieht und ausser der Verbindung mit 2 Atomen Silber noch Verbindungen mit einem höheren Gehalt an Silber, vermuthlich eine mit 3 Atomen Silber, bildet. Dasselbe wurde auch bei mehreren Präparaten von Argininsilber beobachtet.¹⁾ Es ist bemerkenswerth, dass der Silbergehalt der Substanz Nr. 2, wie auch der der meisten Präparate von Argininsilber, dem Silbergehalte einer Verbindung resp. eines Gemisches von 3 Molekülen der Silberbase mit 2 Atomen Silber und 1 Molekül der Silberbase mit 3 Atomen Silber entspricht:

Gefunden für	Berechnet für
das Carnosinsilber Nr. 2:	$3C_6H_{14}Ag_2N_4O_4 + C_6H_{13}Ag_3N_4O_4$
Ag 49,42%	49,66%
Gefunden für	Berechnet für
3 Präparate von Argininsilber:	$3C_6H_{14}Ag_2N_4O_3 + C_6H_{13}Ag_3N_4O$
55,68% ; 55,83% und 55,75% ; 55,60%	56,10%

Das Carnosinsilber schmilzt beim Erwärmen nicht, sondern wird bei etwa 195° C. ganz schwarz und bläht sich dabei auf.

Das trockene Carnosinsilber stellt eine weisse Masse dar, die sich leicht zu einem sehr feinen Pulver zerreiben lässt. Das Carnosinsilber ist lichtempfindlich. Es löst sich sehr schwer in kaltem Wasser, etwas leichter in heissem; in Säuren und in Ammoniak löst sich die noch feuchte Verbindung leicht auf. Die Löslichkeit derselben in Wasser wird durch die Gegenwart des freien Carnosins bedeutend erhöht; in Folge dessen löst sich der durch ein Alkali in einer Lösung von Carnosinsilbernitrat erzeugte Niederschlag in Wasser merklich, besonders beim Erwärmen, während derselbe Niederschlag in ausgewaschenem Zustande, wie auch die bei Gegenwart von überschüssigem Silbernitrat dargestellte Verbindung in Wasser sehr schwer löslich sind. Durch die Gegenwart überschüssigen Silbernitrats wird nämlich die Bildung des freien Carnosins verhindert. Für die Löslichkeitsbestimmung wurde das Carnosinsilber Nr. 2 verwendet; dasselbe wurde sehr sorgfältig ausgewaschen und eine längere Zeit mit destillirtem Wasser unter häufigem Schütteln digerirt; aus dem Filtrate wurde

¹⁾ Wl. Gulewitsch, l. c., S. 206.

das Silber als Silberchlorid gefällt. Bei der Ausrechnung wurde der Gehalt dieses Carnosinsilbers an Silber gleich 49,42% angenommen.

VII. 290 cem. der Lösung gaben 0.0272 g AgCl.

Daraus folgt, dass sich in 1 Liter destillirten Wassers 0.067 g Carnosin in Form von Carnosinsilber bei der gewöhnlichen Temperatur lösen. Das Carnosinsilber ist somit beinahe zweimal so löslich als Argininsilber; im Uebrigen sind aber die Löslichkeitsverhältnisse dieser Verbindungen ganz analog.

Carnosinkupfer. Beim Kochen der Lösung von reinem Carnosin mit Kupfercarbonat entstand eine tief blaue Lösung, aus der kleine dunkelblaue Kryställchen sich schon während des Kochens an der Oberfläche der Flüssigkeit, hauptsächlich aber an den Wänden des Gefässes ausschieden. Die durch den Heisswassertrichter filtrirte Lösung lieferte dieselben Krystalle, die ausgewaschen, bei 125° C. getrocknet¹⁾ und analysirt wurden:

VIII. 0.2323 g Substanz gaben beim Verbrennen im Schüttchen 0.3009 g CO₂, 0.1051 g H₂O und 0.0606 g CuO.

IX. 0.2666 g Substanz lieferten 43.0 cem. feuchten N (21° C., 748 mm. Bar.)

X. 0.2599 g Substanz gaben 41.9 cem. feuchten N (22.5° C., 747 mm. Bar.).

	Gefunden:			Berechnet für	
	VIII.	IX.	X.	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃ · CuO:	C ₉ H ₁₅ N ₄ O ₃ · CuO:
C	35.33%	—	—	35.31%	35.08%
H	5.07%	—	—	4.62%	5.25%
N	—	17.99%	17.82%	18.36%	18.24%
Cu	20.85%	—	—	20.79%	20.65%
O	—	—	—	20.92%	20.78%

Das Carnosinkupfer zersetzt sich bei etwa 220° C. vollständig, ohne zu schmelzen. Obgleich die Verbindung in kaltem Wasser schwer löslich ist, eignet sich dieselbe wenig zur Isolirung und Reinigung des Carnosins, da der Löslichkeitsunterschied in kaltem und in heissem Wasser nicht genügend gross ist; um das Carnosinkupfer in die Lösung zu bringen,

¹⁾ Die Substanz war schwer zur Gewichtskonstanz zu bringen; es ist möglich, dass die Verbindung bei 125° C. Spuren z. B. von Ammoniak verliert.

muss man die Krystalle desselben mit verhältnissmässig viel Wasser wiederholt auskochen, und beim Eindampfen der Lösung zersetzt sich dieselbe theilweise unter Abscheidung von etwas Kupferoxyd. Zur Identificirung des Carnosins aber kann die Kupferverbindung desselben die besten Dienste leisten, da sie sich in sehr charakteristischen Krystallen ausscheidet. Diese tiefblau gefärbten, kaum 1 mm. Grösse erreichenden Krystalle erscheinen unter dem Mikroskop am häufigsten als sechseckige, ganz regelmässig ausgebildete oder verlängerte Tafeln, die mit blaugefärbten Cystinkrystallen am besten verglichen werden können. Im polarisirten Licht lassen sich sogleich zwei Arten von scheinbar ganz gleichen Tafeln unterscheiden. Ein Theil der Tafeln ist isotrop und zeigt im convergenten polarisirten Lichte die Interferenzfigur des einachsigen circularpolarisirenden Krystalles ohne Anomalie: der Charakter der Doppelbrechung ist positiv: die Linearwinkel dieser Tafeln betragen 120° .¹⁾ Die anderen Tafeln haben einen Linearwinkel von etwa 105° und sind anisotrop: parallel der längeren Kante verläuft die Axe der grösseren Elasticität: im convergenten polarisirten Lichte sind entweder der eine oder der andere Balken sichtbar, welche bei der Drehung des Tisches mit einander abwechselnd das Feld durchstreifen, indem sie den Ocularfaden parallel bleiben. Die ersten häufiger vorkommenden Tafeln können als Pinakoide des hexagonalen Systems aufgefasst werden: die anisotropen Tafeln können Rhomboëderflächen sein, da einige dickere Krystalle beobachtet wurden, die einen vollständigen Rhomboëderhabitus hatten. Manche dickere Krystalle schienen auch eine Combination von Prisma, Rhomboëder und Pinakoid vorzustellen. Seltener als die oben beschriebenen Tafeln gewahrt man die viereckigen Rhomboëderflächen, die dreieckigen Tafeln und die auf einer schmalen Fläche liegenden Krystalle, die bisweilen sternförmig zusammengewachsen sind.

1) Einige von diesen Tafeln liegen etwas schräg, sind in Folge dessen schwach anisotrop und zeigen einen excentrischen Austritt der optischen Axe.

Zum Schluss unserer Abhandlung möchten wir nochmals auf eine auffallende Analogie aufmerksam machen, die zwischen den Verbindungen von Carnosin und denen von Arginin nicht zu verkennen ist. Das Verhalten bei dem Isolirungsverfahren, die Eigenschaften von den Nitraten, von den freien Basen, vor Allem aber von den Silberbasen, die Einwirkung auf das polarisirte Licht, die Fähigkeit, Silber- und Kupferdoppelsalze¹⁾ zu bilden, sind dem Carnosin und dem Arginin gemeinsam. Die bis jetzt beobachteten Unterschiede zwischen den Verbindungen dieser und jener Base sind nur quantitativ: so sind alle bis jetzt untersuchten Verbindungen von Carnosin leichter löslich als die von Arginin; desgleichen ist das Molekular-drehungsvermögen von Carnosinnitrat grösser als das von Arginnitrat.

Weitere Untersuchungen über das Carnosin und in erster Linie die Versuche über die Spaltung dieser interessanten Base, wie auch über ihre etwaige pharmakologische Wirkung werden von uns in Angriff genommen. Obgleich die Vermuthung sehr unwahrscheinlich ist, dass eine Verbindung von der Zusammensetzung des Carnosins ein künstliches Produkt sei, das sich bei der Bereitung des Fleischextractes gebildet habe, sollen doch zum Ueberfluss auch Untersuchungen über das Vorkommen von Carnosin in den aus den Muskeln mit den nöthigen Cauteleu dargestellten Auszügen ausgeführt werden.

Akulowka, den 8. August 1900.

1) Das Carnosin bildet ein Kupfernitratdoppelsalz, welches nicht näher untersucht wurde.