

## Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln.

### IV. Mitteilung.

#### Über das Vorkommen des Carnosins, Carnitins und Methylguanidins im Fleisch.

Von

**R. Krimberg.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Moskau.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juli 1906.)

Im Jahre 1900 erschien die erste Mitteilung von Wl. Gulewitsch über die Extraktivstoffe der Muskeln. Die Arbeit war gemeinschaftlich mit S. Amiradžibi ausgeführt worden und hatte zur Entdeckung des Carnosins in Liebigs Fleischextrakt geführt.<sup>1)</sup> Als ich später auf die Veranlassung und unter der Leitung meines hochgeehrten Lehrers des Herrn Prof. Wl. Gulewitsch, wofür ich ihm an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche, zur Fortsetzung dieser Arbeiten schritt, erwies es sich, daß die neuentdeckte Base im genannten Fleischextrakte in recht bedeutender Menge enthalten, und daß der Gehalt der verschiedenen verarbeiteten Proben des Extraktes an dieser Base keinen großen Schwankungen unterworfen ist. Hieraus konnte man den Schluß ziehen, daß das Carnosin, höchstwahrscheinlich, ein ständiger Bestandteil der Muskeln ist, daß das Vorkommen dieser Base in Liebigs Fleischextrakt nicht auf irgend welche sich im Muskelgewebe abspielende postmortalen chemischen Prozesse oder gar auf die bei der Bereitung resp. bei dem Aufbewahren des Extraktes statthabenden Zersetzungserscheinungen zurückzuführen ist, sondern daß dieselbe im tierischen Organismus schon *intra vitam* vorkommt. Was dagegen die zweite, von Wl. Gulewitsch und mir ebenfalls in Liebigs Fleischextrakt entdeckte Base, das Carnitin,<sup>2)</sup> anbelangt, so schien der intravitale Ursprung dieses Körpers

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 565, und Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1902.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 326.

weniger sicher zu sein. Die weiteren Versuche über das Carnitin haben nämlich gezeigt, daß zwar auch diese Base unzweifelhaft als ein ständiger Bestandteil des Liebigschen Fleischextraktes anzusehen, daß ihre Ausbeute aus demselben aber eine geringere als die des Carnosins ist. Hierbei ist zu bemerken, daß eine befriedigende Bestimmung der Ausbeute des Carnitins vorläufig noch beinahe unmöglich ist, weil es erst nach vorangehender, sehr komplizierter Bearbeitung des Fleischextraktes isoliert wird, und weil seine Ausscheidung und Reinigung in der Form der Sublimat- und Phosphorwolframsäureverbindungen mit ziemlich großen Verlusten verknüpft ist. Endlich, der dritte Körper, von welchem unten die Rede sein wird, das Methylguanidin, ist neuerdings im Fleischextrakte von zwei Forschern unabhängig von einander und auf verschiedenem Wege entdeckt worden. Der eine dieser Forscher, Fr. Kutscher,<sup>1)</sup> berührt die Frage über den möglichen Ursprung dieses Körpers gar nicht, der andere, Wl. Gulewitsch,<sup>2)</sup> dagegen hatte sich für den intravitalen Ursprung des Methylguanidins ausgesprochen. Um die Frage über das Vorkommen der drei genannten Körper im Muskelgewebe als dessen präformierte Bestandteile endgültig zu entscheiden, stellte ich mir zum Ziel, dieselben direkt aus dem Fleische zu gewinnen. Das Verfahren, welches ich dazu benutzt habe, ist das von Wl. Gulewitsch ausgearbeitete, wie dasselbe in seinen soeben angeführten Arbeiten im allgemeinen beschrieben ist.

Unmittelbar nach dem Schlachten eines Ochsen wurde ein Stück Fleisch (Rippenkreuz) ausgeschnitten, nach Möglichkeit von Knochen, Fett und Bindegewebe gereinigt, schnell in dünne Scheiben und Stückchen geschnitten und sofort in kochendes Wasser geworfen. Die Operation der Reinigung und Zerkleinerung des Fleisches dauerte ungefähr eine halbe Stunde. Das Gewicht des auf solche Weise gewonnenen Muskelgewebes betrug 4,5 kg. Nachdem alles Fleisch ins Wasser gebracht war, wurde die Flüssigkeit noch eine halbe Stunde gekocht. Dann wurde das Fleisch fein zerhackt und mit der abgegossenen

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel, Bd. X, S. 531.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 475.

Flüssigkeit noch eine Stunde gekocht. Alsdann wurde die Flüssigkeit durch Musselin kolliert, und das mit Hilfe eines Handtuchs ausgepreßte Fleisch auf die angegebene Weise mit frischem Wasser noch zweimal ausgekocht. Die vereinigten gelblich gefärbten Auszüge betragen ungefähr 25 l und reagierten amphoter auf Lackmus. Sie wurden bis auf 2 l eingeengt und mit einer 20%igen Lösung von neutralem essigsäuren Blei gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und gewaschen, das Filtrat mittels Schwefelwasserstoff entbleit. Das Filtrat vom Schwefelblei wurde bis auf etwa  $\frac{3}{4}$  l eingeengt und mit einer konzentrierten Lösung von Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines größeren Überschusses derselben ausgefällt. Der entstandene reichliche Niederschlag wurde am anderen Tag abgesaugt, gewaschen und durch Zerreiben mit Barythydrat bei Zimmertemperatur zersetzt. Das durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreite Filtrat wurde mit Salpetersäure neutralisiert, bis auf etwa  $\frac{1}{2}$  l eingedampft und mit 20%iger Silbernitratlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Die ausgeschiedenen Silberverbindungen der Alloxurbasen wurden abgesaugt und gewaschen, und zum Filtrat weitere Mengen der Silbernitratlösung hinzugefügt, bis eine kleine Probe der Flüssigkeit auf einem Uhrglase mit Barythydrat vermischt, keine weiße, sondern eine gelbe, schnell schwarz werdende Fällung lieferte. Darauf wurde die Flüssigkeit mit einer warmen gesättigten Lösung von Barythydrat ausgefällt, der ziemlich reichliche Niederschlag abgesaugt und sorgfältig gewaschen.

Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, die Flüssigkeit durch Absaugen vom Schwefelsilber befreit, mit Kohlensäure gesättigt, nochmals filtriert, eingeengt und mit Salpetersäure neutralisiert. Bald darauf erstarrte die eingeengte Flüssigkeit zu einer Masse, welche aus sternartigen Drusen von nadelförmigen Krystallen bestand. Dieselben wurden abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen. Einmal umkrystallisiert, wog diese Fraktion 2,4 g. Die Substanz wurde im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei sie kein Krystallwasser verlor, und zur Bestimmung des Stickstoffs und der spezifischen Drehung angewandt.

Aus 0,1694 g Substanz wurden 35,95 ccm N bei 17° und 754 mm Bar. erhalten.

Gefunden:                      Berechnet für  $C_9H_{14}N_4O_8 \cdot HNO_3$ :

N = 24,23%                      24,26%

Eine wässrige Lösung der Substanz bei  $p = 8,212\%$ ,  $t = 15^\circ$  und  $l = 100$  mm ergab

$$\alpha = + 1,92^\circ \text{ oder } [\alpha]_D^{15} = + 22,6^\circ.$$

Die Ergebnisse der Bestimmung des Stickstoffs und der spezifischen Drehung zeigen also unzweifelhaft, daß die gewonnene Substanz das salpetersaure Salz des Carnosins ist. Nach den neueren noch nicht veröffentlichten genauen Bestimmungen, deren Ergebnisse mir von Herrn Prof. Wl. Gulewitsch freundlicherweise mitgeteilt worden sind, muß nämlich die spezifische Drehung des Carnosinnitrats auf  $+ 22,53^\circ$  bei  $p = 8,097\%$  und  $t = 19^\circ$  geschätzt werden.

Aus den beiden vereinigten Mutterlaugen wurden noch zwei weitere Fraktionen ebensolcher Krystalle gewonnen, die eine wog 3 g und die andere 2 g. Diese letzte Fraktion war stark gelblich gefärbt und schmolz bei etwa 200°. Sie wurde mit Tierkohle behandelt und noch einmal umkrystallisiert, wonach ihr Schmelzpunkt bis auf 210—212° stieg; nach den Bestimmungen von Wl. Gulewitsch und S. Amiradžibi<sup>1)</sup> schmilzt das Carnosinnitrat bei 211—212°. Nach dem Einengen der letzten Mutterlauge wurde ein dicker, gelber, nicht krystallisierbarer Sirup erhalten. Im ganzen wurden also aus 4,5 kg Fleisch 7,4 g Carnosinnitrat isoliert.

Das Filtrat vom Carnosinsilber wurde mit Kohlensäure gesättigt, der Niederschlag abgesaugt und gewaschen. Aus dem neuen Filtrat wurde das Carnitin nach dem von Gulewitsch und mir<sup>2)</sup> beschriebenen Verfahren isoliert, mit dem Unterschiede, daß zur Fällung des Carnitins anstatt der Platinchlorwasserstoffsäure die Goldchlorwasserstoffsäure angewandt wurde, und daß das Carnitin vor dieser Fällung durch fraktionierte, unter der Kontrolle der mikroskopischen Untersuchung<sup>3)</sup> durch-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 567.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 327—328.

<sup>3)</sup> Alle krystallographischen Untersuchungen wurden von Herrn Prof. Gulewitsch in sehr liebenswürdiger Weise ausgeführt.

geführte Krystallisation seines Phosphorwolframats aus heißem Wasser gereinigt wurde. Diejenigen Fraktionen, welche sich als aus dem Carnitinphosphorwolframat bestehend erwiesen, wurden auf die übliche Weise mit Barythydrat zersetzt und zu der nach dem Entfernen des überschüssigen Baryts erhaltenen, stark alkalisch reagierenden Flüssigkeit so viel verdünnte Salzsäure hinzugefügt, bis damit befeuchtetes rotes Kongopapier eine schwach blaue Färbung zeigte. Darauf wurde die Flüssigkeit mit Goldchlorwasserstoffsäure ausgefällt, wobei sich im Anfang eine kleine Menge dunkles orangegelbes Öl ausschied, welches bei weiterer Hinzufügung des Fällungsmittels und beim Drücken mit einem Glasstabe während einiger Minuten krystallinisch wurde und eine citronengelbe Farbe annahm. Der Hauptteil des Niederschlages fiel jedoch gleich krystallinisch und citronengelb aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt, ein wenig gewaschen und aus warmem Wasser umkrystallisiert. Bei langsamem Erkalten der Lösung schied sich ein Teil der Goldverbindung zunächst wieder als ein Öl ab, welches sehr bald zu einem spröden, ziemlich dicken, dunklen orangefarbenen Plättchen am Boden des Glases erstarrte, der andere Teil darauf aber in der Form von citronengelben bis zu etwa 1 cm langen Nadeln. Die Nadeln wurden gesammelt und mit wenig Wasser gewaschen. Bei der krystallographischen Untersuchung erwiesen sie sich als mit den Krystallen der Goldverbindung des Carnitins identisch. Darauf wurden sie zerrieben, bei 100—103° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei sie kein Krystallwasser verloren, und analysiert.

0,1803 g Substanz im Porzellantiegel verbrannt hinterließen 0,0708 g Gold.

Gefunden:	Berechnet für $C_7H_{16}NO_3Cl \cdot AuCl_3$ :
Au = 39,27%	39,35%

Die Substanz schmolz bei 153—154° zu einer vollständig klaren, roten Flüssigkeit, die nach dem Erkalten wieder krystallinisch erstarrte.

Aus dem Filtrat von der das Carnitin enthaltenden Sublimatfällung<sup>1)</sup> wurde der Alkohol verjagt, der Rückstand mit Schwefelwasserstoff zersetzt, der Quecksilbersulfidniederschlag abgesaugt,

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 328.

das neue Filtrat mit Soda neutralisiert, eingeengt und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, sorgfältig gewaschen und auf die bekannte Weise mit Barythydrat zerrieben. Die vom Baryt befreite und stark alkalisch reagierende Flüssigkeit wurde mit verdünnter Salpetersäure neutralisiert, stark eingeengt und stehen gelassen. Bald darauf schieden sich glänzende Täfelchen ab, welche sich bei der krystallographischen Untersuchung als die charakteristischen Krystalle des Methylguanidinnitrats erwiesen. In kaltem Wasser war die Substanz bedeutend schwerer löslich als in warmem. Zerrieben und getrocknet schmolz sie ähnlich dem Methylguanidinnitrat genau bei  $150^{\circ}$  zu einer farblosen, klaren Flüssigkeit, welche beim Erkalten wieder krystallinisch erstarrte.

Die Ergebnisse der ausgeführten Arbeit beweisen also, daß die im Fleischextrakte gefundenen Körper, das Carnosin, das Carnitin und das Methylguanidin, im tierischen Muskel schon *intra vitam* vorhanden sind. Selbstverständlich darf dieser Satz mit der Reserve ausgesprochen werden, mit der man überhaupt von einem intravitalem Ursprung der Körper, welche man aus dem Fleisch soeben getöteter Tiere zu isolieren imstande ist, sprechen kann. Die beiden letzten neuentdeckten Bestandteile des lebenden Muskels sind darin in einer solchen Quantität enthalten, daß sie aus dem Fleisch jedenfalls ohne größere Mühe isoliert und identifiziert werden können. Höchst überraschend ist aber die Menge des im Muskel enthaltenen Carnosins. Aus 4,5 kg Fleisch, sogar nicht von der besten Sorte, habe ich, wie schon erwähnt, 7,4 g salpetersaures Carnosin oder 5,8 g reines Carnosin gewonnen, was auf frische und feuchte Muskeln berechnet 1,3‰ reines Carnosin beträgt. Hier ist noch zu bemerken, daß die Isolierung des Carnosins in meiner Arbeit nicht quantitativ durchgeführt wurde, und daß ein kleiner Teil desselben noch in der letzten Mutterlauge zurückblieb und nicht auskrystallisierte. Aber sogar auch bei einer Ausbeute von 1,3‰ kann von allen bis jetzt bekannten stickstoffhaltigen Extraktivstoffen, was ihren Gehalt in den Muskeln anbelangt, nur das Kreatin mit dem Carnosin verglichen werden. Nach

C. Neubauer,<sup>1)</sup> welcher das Kreatin quantitativ bestimmte, beträgt nämlich die Menge des in verschiedenen Proben Rindfleisch enthaltenen Kreatins 1,5—2,0‰. Nach den Angaben einiger älterer Forscher dagegen ist die Menge des Kreatins eine viel geringere. Z. B. Liebig<sup>2)</sup> konnte aus 86 Pfund Ochsenfleisch 30 g Kreatin isolieren, ein Gehalt, der nur 0,70‰ beträgt.

Zum Schluß würde ich mir noch erlauben, die Vermutung auszusprechen, daß das neuerdings von Fr. Kutscher in Liebigs Fleischextrakt entdeckte Novain<sup>3)</sup> höchstwahrscheinlich mit dem Carnitin identisch ist. Ebenso wie die Goldverbindung des Novains, krystallisiert auch die Goldverbindung des Carnitins in zweierlei Art Krystallen, nämlich in groben, orangefarbenen Nadeln oder Säulen und in feinen hellgelben Nadelchen und Blättchen. Der Schmelzpunkt einer aus Liebigs Fleischextrakt gewonnenen Goldverbindung des Carnitins lag bei 150°, dagegen dasselbe Salz, direkt aus Fleisch bereitet, schmolz, wie oben erwähnt, etwas höher, nämlich bei 153—154°. Das Goldsalz des aus Liebigs Fleischextrakt gewonnenen Novains schmolz, wie Fr. Kutscher angibt, zwar bei 155°, dagegen aber ein anderes Novaingoldchlorid, welches derselbe Forscher aus dem Hundeharn, nach Verfütterung von Liebigs Fleischextrakt, gewonnen hatte, wies einen tiefer gelegenen Schmelzpunkt auf, obwohl sein Goldwert sich durch weitere Umkrystallisation nicht ändern ließ.<sup>4)</sup> Was endlich den von Fr. Kutscher bei den Analysen<sup>5)</sup> gefundenen Goldwert des Novaingoldchlorids (39,7 bis 39,9‰ Au) anbelangt, so bleibt derselbe, und darauf macht Fr. Kutscher selbst aufmerksam, stets merklich hinter dem für die Formel  $C_7H_{18}NO_2Cl \cdot AuCl_3$  berechneten (40,5‰ Au) zurück, während die Formel des Carnitingoldchlorids  $C_7H_{16}NO_3Cl \cdot AuCl_3$  nur 39,35‰ Gold verlangt.

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. analyt. Chem., Bd. II, S. 28.

<sup>2)</sup> Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. LXII, S. 292.

<sup>3)</sup> Zeitschrift f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel, Bd. X, S. 533.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 3.

<sup>5)</sup> Zeitschrift f. Untersuch. d. Nahrungs- und Genußmittel, Bd. X, S. 534 und 537.