

# Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse.

Von

**R. Gottlieb** und **R. Stangassinger.**

---

Mit zwei Figuren im Text.

---

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. April 1907.)

---

Die Fragen des Kreatinstoffwechsels haben, wie aus mehreren neueren Arbeiten hervorgeht, das Interesse der physiologischen Chemiker in letzter Zeit wieder in erhöhtem Maße auf sich gelenkt. Die ältere Ansicht, daß das Kreatin ein spezifisches Produkt des Muskelstoffwechsels sei, das im Stoffwechsel, abgesehen von seiner Umwandlung in Kreatinin, kaum angegriffen werde, ist schon lange von einzelnen Autoren, z. B. Bunge,<sup>1)</sup> Neumeister,<sup>2)</sup> bezweifelt worden. Diese ältere Ansicht von der Unangreifbarkeit des Kreatins im Stoffwechsel stützte sich auf Versuche von Meissner,<sup>3)</sup> Voit,<sup>4)</sup> Mallet,<sup>5)</sup> nach denen verfüttertes Kreatin und Kreatinin zum größten Teile als Kreatinin im Harn erscheint. Aber abgesehen von dem Einwande, daß man das Schicksal des von außen eingeführten Kreatins nicht mit dem im Stoffwechsel selbst entstandenen identifizieren dürfe, ist in neueren Versuchen auch ein mehr oder weniger weitgehendes Zurückbleiben der Ausscheidung gegenüber der Zuführung der beiden Körper beobachtet

---

<sup>1)</sup> v. Bunge, Lehrb. d. physiol. u. pathol. Chemie, 4. Aufl., Leipzig 1898, S. 322.

<sup>2)</sup> Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chemie, 2. Aufl., Jena 1897, S. 431.

<sup>3)</sup> Meissner, Zeitschrift f. rationelle Medizin, Bd. XXXI, S. 283, 1868.

<sup>4)</sup> Voit, Zeitschrift f. Biologie, Bd. IV, S. 111, 1868.

<sup>5)</sup> Mallet, U. S. Dep. of Agriculture Bull. 66. 1899.

worden. So fand Czernecki,<sup>1)</sup> daß am Kaninchen jedenfalls «nur ein sehr kleiner Teil des eingegebenen Kreatins als Kreatinin im Harn erscheint». Auch Achelis<sup>2)</sup> schließt aus Versuchen am Hunde und am Menschen, mit sehr reichlicher Kreatininzugabe zur Nahrung, «daß ein beträchtlicher Teil des Kreatinins zerstört wird». Dagegen haben van Hoogenhuyze und Verploegh<sup>3)</sup> in Selbstversuchen den größten Teil von eingeführtem Kreatinin im Harn wiedergefunden. Klercker,<sup>4)</sup> der Kreatin und Kreatinin zusammen per os in Form von Liebigschem Fleischextrakt in wechselnden Mengen einnahm, beobachtete eine Ausscheidung von 45 und 63<sup>0/0</sup> des verabreichten Kreatinins und von 20 und 31<sup>0/0</sup> des Kreatins. Folin<sup>5)</sup> endlich gibt neuerdings an, daß er eingenommenes Kreatin weder als Kreatin nachweisen noch überhaupt eine Stickstoffvermehrung des Harns darnach konstatieren konnte, eine Angabe, welche allerdings mit allen bisherigen Beobachtungen in Widerspruch steht.

Das Kreatin und sein Anhydrid scheinen demnach im Stoffwechsel keineswegs so schwer angreifbar zu sein, als man früher glaubte. Es war deshalb von Interesse, das Verhalten dieser Substanzen bei der Autolyse verschiedener Organe zu prüfen.

#### Zur Methode.

Für die Verfolgung derartiger Fragen war es notwendig, eine zur Ausführung längerer Versuchsreihen geeignete Methode auszuarbeiten, welche Kreatin und Kreatinin mit genügender Genauigkeit nebeneinander zu bestimmen gestattet. Das Neubauer-Salkowskische Verfahren ist nicht bloß langwierig und erfordert große Mengen von Untersuchungsmaterial; die Fällung des Kreatinins als Chlorzinkverbindung ist überdies

<sup>1)</sup> Czernecki, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 294, 1905.

<sup>2)</sup> Achelis, Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 10, 1906.

<sup>3)</sup> Van Hoogenhuyze u. Verploegh, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 415, 1905.

<sup>4)</sup> Klercker, Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Path., Bd. VIII, S. 59, 1906.

<sup>5)</sup> Folin, Festschrift für O. Hammarsten, 1906.

in Organextrakten unzuverlässig. Hingegen erschien die kolorimetrische Methode von Folin<sup>1)</sup> für die Kreatininbestimmung unseren Zwecken zu entsprechen. Nur für die quantitative Umwandlung von Kreatin in Kreatinin zu seiner nachfolgenden Bestimmung als Kreatinin waren zur Zeit, als wir unsere Versuche begannen, noch ungenügende Vorschriften gegeben. Erst nach dem Abschluß unserer methodischen Vorarbeiten, sowie eines großen Teiles unserer Autolyseversuche erschien im vorigen August eine inhaltsreiche Untersuchung Jaffés,<sup>2)</sup> welche u. a. auch die Bedingungen der Umwandlung von Kreatin in sein Anhydrid für den Zweck einer quantitativen Bestimmung (durch vorherige Pikrinsäurefällung, Zersetzung des Produkts und Wägung des auf diese Weise gereinigten Kreatinins als Kreatininchlorzink) feststellte.

Wir hatten uns somit die Aufgabe zu stellen, die Folin'sche Kreatininbestimmung in einer für unsere Zwecke geeigneten Weise zu modifizieren und die Umwandlung von Kreatin in Kreatinin zur quantitativen Bestimmung des Kreatins zu studieren.

Das Prinzip der Folin'schen Methode beruht auf der kolorimetrischen Verwertung der Jafféschen Pikrinsäurereaktion. Die Farbenintensität der durch alkalische Pikrinsäure in Kreatininlösung hervorgerufenen Rotfärbung wird in bestimmter Schichtlänge mit einer gleich gefärbten Standardlösung verglichen, für welche Folin  $n/2$ -Kaliumdichromatlösung wählte. Folin benützte zur Vergleichung ein Kolorimeter nach Dubosq. Van Hoogenhuyze und Verploegh — unseres Wissens die ersten, die nach Folin's Methode umfangreiche Studien über die Kreatininausscheidung beim Menschen ausführten, — bedienten sich zur Vergleichung eines Apparates eigener Konstruktion, der nach ihren Angaben den Anforderungen entsprach. Eine möglichst genaue Einstellung der beiden Farbfelder auf die gleiche Färbungsintensität erscheint wegen der Empfindlichkeit der Jafféschen Reaktion dringend geboten, da sich

---

<sup>1)</sup> Folin, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 223.

<sup>2)</sup> Jaffé, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 430, 1906.

die durch ungenaue Vergleichung entstehenden Fehler beim Umrechnen auf größere Mengen ganz bedeutend multiplizieren. Wir haben für diese Bestimmungen ein billiges Kolorimeter ohne Prismenverwendung konstruiert.

Zunächst möge das Prinzip unseres Apparates durch eine Skizze des Ganges der Lichtstrahlen erläutert werden.

Die von den Spiegeln  $S, S_1$  reflektierten Lichtstrahlen passieren die gefärbten Flüssigkeitssäulen  $F, F_1$ ; sie treffen dann hälftiglich auf die geschwärzte Rückseite der Spiegel  $C, C_1$ , wo sie absorbiert werden, hälftiglich aber auf die Spiegel  $B, B_1$ . Von  $B, B_1$  werden die Strahlen nach  $C, C_1$  reflektiert; nach abermaliger Zurückwerfung gelangen dieselben dann parallel nach  $A$  in das beobachtende Auge. Getrennt sind die Farbenteilfelder durch einen schmalen, schwarzen Strich, der durch Zusammenstoß der Spiegel  $C, C_1$  entsteht.

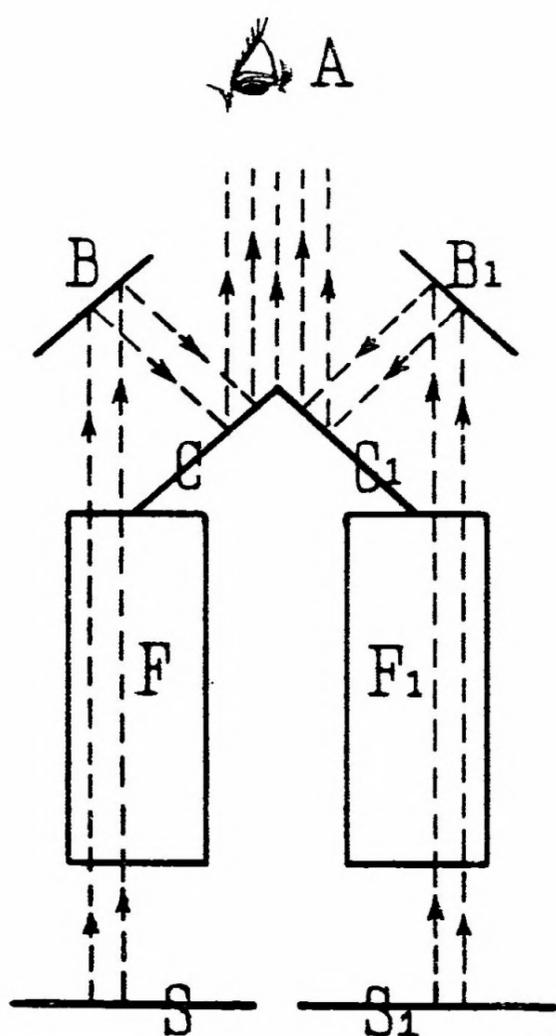


Fig. 1.

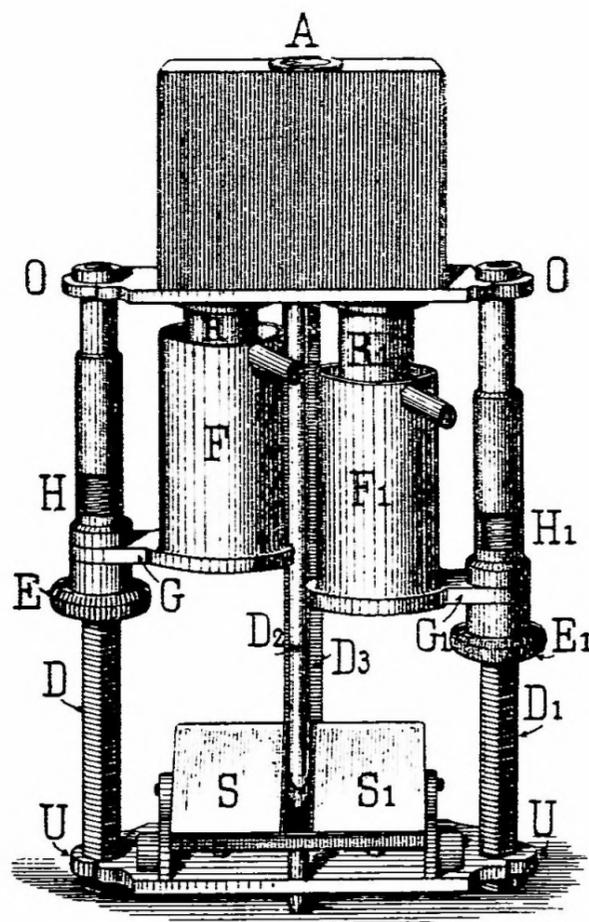


Fig. 2.

Unser Kolorimeter stammt aus der Werkstatt von H. Runne in Heidelberg. In vorstehender Figur 2 ist es  $\frac{2}{5}$  der natürlichen Größe dargestellt.

Von der Fußplatte  $U$  gehen vier Pfeiler  $D, D_1, D_2, D_3$  in die Höhe, die durch Schrauben mit der oberen, den schwarzen Kasten tragenden Platte  $O$  verbunden ist. Die Säulen  $D, D_1$  sind mit Schraubengewinden von 1 mm Ganghöhe ausgestattet, auf denen die Schraubenmuttern  $E, E_1$

auf- und abbewegt werden können. Der Umfang von E, E<sub>1</sub> ist in zehn Teile geteilt, mit Marken versehen und gestattet  $\frac{1}{10}$  mm Ablesung. Durch Drehung der Schrauben E, E<sub>1</sub> wird das starre Trägergleitstück G, G<sub>1</sub> — bestehend aus Gleitrohr und Trägerplatte mit Ausschnitt — bewegt und die Höhenänderung in dem Ausschnitt H, H<sub>1</sub> dieses Gleitrohres auf E, E<sub>1</sub> an der Millimeterskala abgelesen. Das Gleitstück trägt abnehmbar den zur Aufnahme der Flüssigkeiten bestimmten und mit Ausguß versehenen Zylinder F, F<sub>1</sub>, dessen Boden durch eine planparallele Glasplatte gebildet wird. In diesen beweglichen Zylinder ragt eine engere, mit O starr verbundene, Röhre R, R<sub>1</sub> hinein, die unten durch planparalleles Glas verschlossen ist. Liegen nun die beiden parallelen Glasplatten aufeinander, so erscheint der Kreis rein weiß und die Millimeterteilung auf D, D<sub>1</sub> und E, E<sub>1</sub> zeigt Null. Zur sicheren Führung gleitet die Trägerplatte noch in einer Nute auf D<sub>2</sub>; D<sub>3</sub> (in der Figur nicht deutlich sichtbar) vervollkommnet die Stabilität des Apparates. Der schwarze auf O geschraubte Kasten birgt in seinem Inneren die aus Figur 1 ersichtlichen Spiegel B, B<sub>1</sub> und C, C<sub>1</sub>. Das Sehloch A ist durch eine schwach gekrümmte Linse verschlossen. Zur Beleuchtung der Spiegel S, S<sub>1</sub> wurde weißes diffuses Licht benutzt.

Die Handhabung des Apparates ist sehr einfach. In den einen Zylinder C bringt man die gewählte Standardlösung und stellt mit Hilfe der Schraube E die gewählte Höhe der Flüssigkeitssäule zwischen den parallelen Platten der Zylinder C und R genau ein; in den anderen Zylinder C<sub>1</sub> wird die gefärbte Untersuchungsflüssigkeit gegeben und durch Heben oder Senken desselben die zwischen C<sub>1</sub> und R<sub>1</sub> befindliche Flüssigkeitssäule bis zum Eintritt der Farbgleichheit der Teilfelder variiert. Die Höhe dieser dazu erforderlichen Flüssigkeitssäule wird dann abgelesen.

Die quantitativen Kreatininbestimmungen mit diesem Kolorimeter erfolgten nach Folins<sup>1)</sup> Vorschriften. Eine Nachprüfung der von ihm ermittelten Werte mit unserem Apparate ergab fast dieselben Zahlen. So entsprach die Farbenintensität der 8 mm langen Flüssigkeitsschicht einer  $\frac{n}{2}$ -Kaliumbichromatlösung genau der 8,1 mm hohen Flüssigkeitssäule einer nach Folin bereiteten 10 mg Kreatinin enthaltenden Farblösung. Durch einfache Rechnung läßt sich aus den verschieden hohen Flüssigkeitssäulen der Untersuchungslösungen der jeweilige Kreatiningehalt der letzteren ermitteln. Die Übereinstimmung der kolorimetrisch gefundenen Kreatininwerte mit den theoretisch verlangten ist aber, wie auch Folin hervorhebt, nur in ge-

---

<sup>1)</sup> Folin, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 223.

wissen Grenzen eine gute; bei unserem Apparate bewegten sich dieselben zwischen 4,2 mm und 14 mm. Falls größere Quantitäten Untersuchungslösung zur Verfügung stehen, kann durch geeignete Wahl der Konzentration der auf Kreatinin zu prüfenden Lösung die ermittelte Genauigkeitsgrenze eingehalten werden. Reicht aber das vorhandene Material nur zu einer Bestimmung aus und ist der ungefähre geringe Kreatiningehalt der zu prüfenden Lösung unbekannt, so verbürgt nur eine vorher mit reinem Kreatinin durch Aichung des Apparates ermittelte Tabelle genaue Werte.

In reinen Kreatininlösungen mit verschiedenen Konzentrationen wurde zu diesem Zwecke die durch alkalische Pikrinsäure erzielte Farbenintensität gegenüber einer 8 mm hohen Flüssigkeitssäule der  $n/2$ -Kaliumbichromatlösung festgestellt. Dieselbe wurde in Millimetern ausgedrückt. Zu diesen ermittelten Hauptzahlen wurden die dazwischen liegenden Werte durch Interpolation gewonnen. Es seien nachfolgend einige Hauptzahlen mitgeteilt. Dieselben sind in der Weise zu verstehen, daß x mg Kreatin in 500 ccm Farbflüssigkeit zur Farbgleichheit mit 8 mm der  $n/2$ -Kaliumbichromatlösung eine y mm hohe Flüssigkeitssäule verlangten.

Beispiele: 2 mg  $\rightarrow$  36,45 mm; 5 mg  $\rightarrow$  16,17 mm; 10 mg  $\rightarrow$  8,1 mm; 14 mg  $\rightarrow$  5,16 mm; 20 mg  $\rightarrow$  4,20 mm.

Die Ablesungen, bei denen etwa 4,2 mm der Kreatininlösung 8 mm Flüssigkeitssäule der Standardlösung entsprechen, differieren selten mehr als  $1/10$  mm. Ist der Farbenton der Reaktionsflüssigkeit aber abgeblaßter, so reagiert das Auge meist erst auf Farbunterschiede, die z. B. bei einer Höhe von 20 mm Untersuchungslösung 0,5 mm Verschiebung verlangen. Diese Ungenauigkeit der Ablesungen wird aber dadurch annähernd ausgeglichen, daß die Höhe der Flüssigkeitsschichten der Untersuchungslösungen in Millimetern rascher wächst als der Kreatiningehalt der Lösung in Milligrammen resp. in Zehntelmilligrammen.

Die Intensität der durch alkalische Pikrinsäure in Kreatininlösungen hervorgerufenen roten Farbennuancen wird abgesehen vom Kreatiningehalt noch durch verschiedene andere Faktoren beeinflusst. Auf die Wirkung der Temperatur,<sup>1)</sup> auf

---

<sup>1)</sup> Van Hoogenhuyze u. Verploegh, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 420.

den Einfluß der Zeit,<sup>1)</sup> die zwischen Anstellung der Reaktion und Ablesung verfließt, haben van Hoogenhuyze und Verploegh sowie Folin bereits aufmerksam gemacht. Reine Kreatininlösungen und Harne streben rasch nach Anstellung der Jafféschen Reaktion einem Maximum der rötlichen Farbe zu; dasselbe bleibt einige Zeit konstant, um dann zunehmend abzublassen.

Es erübrigt noch, das Verhalten natronalkalischer Pikrinsäurelösungen ohne Kreatininzusatz zu besprechen. Durch geeignet gewählte Konzentrationen von Pikrinsäure und Natronlauge lassen sich fast alle Schattierungen wässriger Kaliumbichromatlösungen nachahmen; durch Erhöhung der Temperatur, durch längeres Stehen vertieft sich zunächst die Farbe von sattgelb zu rot, nach längerem Stehen geht die Farbe wieder mehr in Gelb zurück.

Als Beispiel diene folgendes: 7,5 ccm 1,2%ige Pikrinsäurelösung und 2,5 ccm 10%ige Natronlauge auf 75 ccm verdünnt, gaben nach 1 $\frac{1}{2}$  stündigem Stehen in 8,9 mm hoher Schicht dieselbe Farbe wie 8,0 mm  $n/2$ -Kaliumbichromatlösung; bei der üblichen Berechnung auf 500 ccm würde ein Gehalt von 1,36 mg Kreatinin vorgetäuscht werden.

Daraus folgt, daß die Verwendung von 15 ccm 1,2%iger Pikrinsäurelösung und von 5 ccm 10%iger Natronlauge eine Verdünnung auf 500 ccm erfordern oder bei geringerem Volumen der zu bestimmenden Lösung auch entsprechend geringere Mengen Natriumpikrat genommen werden müssen. Bei diesem Vorgehen werden Fehler vermieden, da bei Einwirkung einer derartig verdünnten natronalkalischen Pikrinsäure auf 10 mg Kreatinin stets die Normalzahl 8,1 erhalten wurde.

Die durch alkalische Pikrinsäure in Kreatininlösungen hervorgerufene rote Färbung soll durch Reduktion<sup>2)</sup> der Pikrinsäure zu Pikraminsäure verursacht sein. Wir können uns von der durch Reduktion bedingten Verfärbung einer Pikrinsäurelösung leicht überzeugen; wenige Tropfen Schwefelammon oder Ferrosulfat, zu einer alkalischen Pikrinsäurelösung gegeben, rufen sofort jenen schönen roten Farbenton hervor.

---

<sup>1)</sup> Folin, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 223.

<sup>2)</sup> Neubauer u. Vogel, Analyse des Harnes, 10. Aufl., S. 393.

Auch andere Substanzen, die im tierischen Organismus auftreten, z. B. Aceton, können mit alkalischer Pikrinsäure einen Kreatiningehalt vortäuschen. Die durch Aceton bedingte rote Farbe steigt dabei rasch zu einem Maximum an und blaßt ebenso rasch wieder ab (rasch im Vergleiche zum Verhalten reiner Kreatininlösungen).

Neuerdings hat Jaffé noch auf das Glykocyamidin<sup>1)</sup> hingewiesen, das ebenfalls die von ihm entdeckte Kreatininreaktion gibt. Nach unseren Erfahrungen ist die durch Glykocyamidin in alkalischer Pikrinsäure hervorgerufene Färbung weniger intensiv;<sup>2)</sup> dieselbe steigt sehr langsam zu sattem Rot an und behält diese Farbe lange bei.

Auf Grund unserer methodischen Versuche können wir die kolorimetrische Kreatininbestimmung für reine Lösungen als eine analytische Methode von großer Genauigkeit und bequemer Handhabung bezeichnen. Für ihre Anwendung auf Organextrakte bedarf dies aber zweier Einschränkungen. Die Methode arbeitet zwar bei der Bestimmung kleiner Kreatininmengen in verdünnten Lösungen mit ausreichender Genauigkeit; handelt es sich aber um die Bestimmung stärkerer Konzentrationen, so muß die Lösung, um die früher angeführten Grenzen der Vergleichbarkeit mit der  $n/2$ -Kaliumbichromatlösung einzuhalten, weiter verdünnt werden. Dadurch entsteht eine Multiplikation des Ablesungsfehlers bei der Berechnung. Ein zweiter, schwerer wiegender Einwand gegen die Methode liegt darin, daß auch noch andere unbekannte Substanzen an der Reduktion der Pikrinsäure in alkalischer Lösung beteiligt sein können. Doch verändern die bisher bekannten Kreatinin vortäuschenden Substanzen unter genauer Einhaltung der von Folin angegebenen Reaktionsbedingungen die Resultate nur wenig. Jedenfalls stellen

---

<sup>1)</sup> Jaffé, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 439.

<sup>2)</sup> 10 mg nur einmal umkrystallisiertes Glykocyamidin erzeugen in 500 ccm Folin'scher Reaktionslösung (15 ccm 1,2%ige Pikrinsäurelösung und 5 ccm 10%ige Natronlauge) nach Verlauf von 5 Min. eine Farbensnuance, die in ca. 22,65 mm hoher Flüssigkeitssäule einer solchen von 8 mm  $n/2$ -Kaliumbichromatlösung entspricht. Nach der üblichen Berechnung würde diese Färbung ca. 3,6 mg Kreatinin vortäuschen.

die nach Folin in organischen Flüssigkeiten ermittelten Kreatininzahlen Maximalwerte dar.

Zur quantitativen Bestimmung des Kreatins neben Kreatinin wandten wir, wie auch Folin, die Umwandlung in Kreatinin und die Berechnung des Kreatinwertes aus der Differenz der Gesamtbestimmung (Kreatin und Kreatinin) und des in einer zweiten Probe ermittelten Kreatinins an. So leicht es aber scheint, das Kreatin durch Entziehung eines Moleküles Wasser in Kreatinin überzuführen, so leicht auch der Nachweis gelingt, daß sich schon beim Behandeln von Kreatin mit heißem Wasser oder mit Säure Kreatinin bildet, so schwierig ist doch die quantitative Umsetzung in sein Anhydrid. Entweder die Überführung ist eine nur unvollständige oder es erfolgt bei weitgehender Säureeinwirkung eine teilweise Zerstörung des gebildeten Kreatinins. (Vgl. Jaffé, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 435.) In der Literatur<sup>1)</sup> fanden sich Mitteilungen, daß die quantitative Umsetzung des Kreatins in das Anhydrid durch verschieden langes Kochen mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure erreicht werde. Die quantitativen Bedingungen der Umsetzung waren aber nirgends genügend festgestellt worden. Auch wir versuchten nach älteren Angaben durch mehrmaliges Abdampfen mit konzentrierter Salzsäure oder durch längeres Behandeln mit verdünnter Schwefelsäure Kreatin quantitativ umzusetzen. Aber die erhaltenen schwankenden Resultate verlangten genauere Festlegung der Umwandlungsbedingungen.

Nachdem die diesbezüglichen Versuche im wesentlichen bereits beendet waren, erschien die erwähnte Arbeit Jaffés,<sup>2)</sup> die sich gleichfalls mit dem Studium dieser Umsetzung befaßte. Unsere Befunde decken sich im großen ganzen mit den von Jaffé<sup>2)</sup> erhaltenen Resultaten; wir glauben aber unsere Werte trotzdem mitteilen zu dürfen, da sie weiteres Material beibringen und nach einer anderen Methode gewonnen sind als die Jaffés. In der folgenden Tabelle auf S. 11 sind diese Versuche zusammengestellt. Dieselben variieren die Anwendung

---

<sup>1)</sup> Folin, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 230 ff. Van Hoogenhuyze u. Verploegh, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 422, 433.

<sup>2)</sup> Jaffé, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 434.

verschiedener Anhydrierungsmittel, verschiedener Konzentrationen derselben und verschiedener Zeiten. Zu unseren Versuchen benutzten wir teils Kahlbaumsches Kreatin, teils stellten wir uns Kreatin aus Liebigs Fleischextrakt<sup>1)</sup> selbst dar, wobei wir uns bald der alten Liebigschen, bald der neueren Kutscher-schen<sup>2)</sup> Methode bedienten. Die Präparate wurden durch wiederholtes Umkrystallisieren ganz frei von Kreatinin gewonnen und mehrere Stunden bei 105° getrocknet.

Die Methodik unserer Versuchsanordnung bedarf noch einiger Erläuterung: Reine Kreatinlösungen von bekanntem Gehalt wurden in einen Erlenmeyerkolben nach Zufügen verdünnter Säuren auf 100 ccm gebracht, so daß der in der Tabelle angegebene Prozentgehalt an Säure erreicht wurde. Die sauren Lösungen wurden, nachdem sie — wie aus der Tabelle ersichtlich — verschieden lange Zeit verschieden hoch erhitzt worden waren, nach dem Erkalten unter Verwendung einiger Tropfen Methylorange als Indikator mit Natronlauge neutralisiert und hierauf mit ein paar Tropfen Salzsäure wieder angesäuert und auf dem Wasserbade eingedampft. Das Abdampfen wurde in fast neutraler Lösung vorgenommen, um die Einwirkung der Säure auf ganz bestimmte Zeiten zu beschränken. Die Jaffésche Reaktion wurde sodann in der erkalteten Lösung und in starker Konzentration angestellt. Nach dem Eindampfen auf ein geringes Volumen kann die Zugabe von Pikrinsäure und Alkali stets im richtigen Mengenverhältnisse für die spätere Verdünnung auf ein bestimmtes Volumen bemessen werden.

Die in der Tabelle zusammengestellten Werte ergeben sonach, daß die Umsetzung der angewandten Kreatinmenge durch 4,32% ige Schwefelsäure bei 100° innerhalb 2½ Stunden (Vers. 1, K) und durch 4,56% ige Salzsäure auf dem kochenden Wasserbade in 2 Stunden (Vers. 2, H, J.) fast quantitativ erfolgen kann. Doch wurden keineswegs immer so günstige Resultate erzielt. Bei größerer Verdünnung der Säure und längerer Ausdehnung der Erhitzungsdauer waren die Resultate schlechtere. Auch Anwendung einer niedrigeren Erhitzungstemperatur (60–65°) und längerer Dauer ergab geringere Kreatininwerte. Die Ver-

---

<sup>1)</sup> Zu besonderem Danke sind wir Liebigs Fleischextraktkompagnie verpflichtet, die unsere Untersuchungen durch kostenlose Überlassung eines größeren Quantums Fleischextrakt unterstützte.

<sup>2)</sup> Kutscher, Zeitschrift f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel, Bd. X, S. 531.

## Versuche zur Umsetzung von Kreatin in Kreatinin.

Num- mer des Ver- su- ches	Säure		Angewandtes Kreatin			Art des Erhitzens	Dauer des Er- hitzens Std.	Gefundenes Kreatinin	
	Be- zeich- nung	Kon- zen- tration %	in mg	ausge- drückt in Kreati- nin mg	gelöst in Wasser ccm			in mg	in %
1. A	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4	5,0	4,314	100	Im kochenden Wasser 100°  Auf Wasserbad 60—65°	3	3,86	89,48
B	»	2,4	10,0	8,628	100		5	8,11	94,00
C	»	4,32	10,0	8,628	100		5	8,09	93,74
D	»	4,32	10,0	8,628	100		3	8,30	96,20
E	»	2,16—3,25	10,0	8,628	200—150		16	8,39	97,24
F	»	2,16—3,25	10,0	8,628	200—150		24	7,63	88,33
G	»	2,16—3,25	10,0	8,628	200—150		43	6,90	79,88
H	»	2,16	10,0	8,628	100		17	8,42	97,59
I	»	2,16	10,0	8,628	100		2	7,50	86,93
K	»	4,32	10,0	8,628	100		2 <sup>1/2</sup>	8,57	99,79
2. A	HCl	0,74	10,0	8,628	100	Im kochenden Wasser 100°  —  Auf Wasserbad 98—100°  —  Auf Wasserbad zur Trockene gedunstet	3	6,30	73,02
B	»	2,28	10,0	8,628	100		3	7,90	91,55
C	»	2,28	12,5	10,782	100		3	9,951	92,29
D	»	2,28	12,5	10,782	100		3	10,025	92,98
E	»	4,56	12,5	10,782	100		3	9,924	92,04
F	»	4,56	15,5	10,782	100		3	10,000	92,75
G	»	4,56	12,5	10,782	100		4	8,970	83,19
H	»	4,56	12,5	10,782	100		2	10,780	99,98
I	»	4,56	12,5	10,782	100		2	10,772	99,96
K	»	22,50	10,0	8,628	20		—	8,325	96,49
3.	Eisessig	10,0	10,0	8,628	100	Auf Wasserbad 60—65°	5	4,70	54,47
4.	Essigsäure- Anhydrid	10,0	10,0	8,628	100	Im koch. Wasser 98—100°	3	7,40	85,77
5.	H <sub>2</sub> O	ø	10,0	8,628	100	Auf Wasserbad 60—65°	48	4,90	56,79

suche, die Jaffé<sup>1)</sup> und Folin<sup>2)</sup> mit größeren Kreatinmengen ausführten, stimmen im allgemeinen mit unseren an kleinen Kreatinmengen gewonnenen Erfahrungen überein. Die Verschlechterung der Ausbeute bei längerer Einwirkung der Säuren scheint hauptsächlich in der Zersetzlichkeit des bereits gebildeten Kreatinins begründet zu sein. Dies beweisen die Versuche 1 E bis G der Tabelle und überdies der folgende Versuch, der das Verhalten von Kreatininlösungen bei Einwirkung von Schwefelsäure verfolgt.

Verhalten von Kreatininlösungen bei Einwirkung  
von Schwefelsäure.

(Versuch 6).

Probe	Säure		Angewandte Menge Kreatinin		Erhitzen		Gefundenes Kreatinin	
	Bezeichnung	Konzentration	in mg	in ccm Wasser gelöst	Art	Dauer	in mg	in %
A	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,41	10	100	Auf Wasserbad bei 60—70°	22 Stunden	9,020	90,20
B	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,41	10	100		24 »	8,919	89,19
C	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,41	10	100		48 »	7,980	79,80

Auf Grund dieser Vorarbeiten wurde zur Bestimmung des Kreatins und Kreatinins in den Autolyseversuchen das folgende Verfahren ausgebildet, für dessen Zuverlässigkeit zahlreiche Parallelproben in den folgenden Versuchsreihen Belege geben.

Die eiweißhaltigen Lösungen wurden in 150 ccm bzw. 300 ccm 5%ige siedende Chlornatriumlösung eingegossen, bis zum Auftreten eben saurer Reaktion mit verdünnter Essigsäure versetzt und rasch aufgekocht. Das auskoagulierte Eiweiß wurde abfiltriert und mit siedendem Wasser gut nachgewaschen; das Filtrat davon wurde in einem Maßkolben auf bestimmtes Volumen gebracht und in zwei Teile geteilt. Die eine Filtrat-hälfte fand zur Untersuchung auf vorhandenes Kreatinin Verwendung. Dieselbe wurde auf dem Wasserbade unter Zusatz von Baryumcarbonat — zur Neutralisation der zugesetzten verdünnten Essigsäure — rasch zur

<sup>1)</sup> Jaffé, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 435.

<sup>2)</sup> Folin, The Chemistry and Biochemistry of Kreatin and Kreatinin, Festschr. f. Olof Hammarsten, Upsala und Wiesbaden 1906.

Trockne gebracht. Die Anstellung der Jafféschen Reaktion erfolgte nach dem früher geschilderten Verfahren. In der zweiten Hälfte des Eiweißfiltrates wurde die Kreatin-plus-Kreatininbestimmung (Gesamtbestimmung) ausgeführt. Diese zweite Filtrathälfte wurde ohne Zusatz von Baryumcarbonat eingeengt und auf 100 ccm mit dem Gehalte von 2,2% Salzsäure gebracht. Die salzsaure Lösung wurde nun zur Umsetzung des vorhandenen Kreatins drei Stunden auf einem lebhaft siedenden Wasserbade erwärmt; nach dieser Zeit wurde der Erlenmeyereinhalte in einer Schale, ohne die Lösung vorher zu neutralisieren, zur Trockne gedunstet. Der so erhaltene Trockenrückstand wurde in wenig Wasser gelöst, bei Zimmertemperatur mit der erforderlichen Menge natronalkalischer Pikrinsäure versetzt, nach 5 Minuten dauernder Einwirkung derselben in einen Maßkolben gespült und auf das erforderliche Volumen verdünnt; von den ausgeschiedenen kohligen Zersetzungsprodukten wurde abfiltriert und die klare Lösung auf den Gesamtgehalt untersucht.

Dieses Verfahren weicht in einigen Punkten von dem früher geschilderten Vorgehen zur Kreatininbestimmung ab. Es hat sich nämlich gezeigt, daß bei Anwesenheit verschiedener organischer Körper das Neutralisieren der zur Umwandlung von Kreatin in Kreatinin zugesetzten Säure unnötig wird, weil die bei dem Eindunsten der Lösung sich konzentrierende Salzsäure in Gegenwart organischer Substanzen ihre Kraft verbraucht; infolgedessen ist eine längere Dauer der Säureeinwirkung beim Eindampfen nicht mehr so schädlich wie bei reinen Lösungen, und man kann somit die bei der Neutralisation entstehenden großen Salzmengen vermeiden. Bei nachträglichem Eindampfen der sauren Lösung genügte auch die dreistündige Erhitzung mit 2,2%iger Salzsäure zur Umsetzung des Kreatins. Bei 4,56%iger salzsaurer Lösung, die wir als Optimum für die Umsetzung reinen Kreatins in 2stündiger Erhitzung erkannt hatten, machte sich der destruirende Einfluß der sich konzentrierenden Säure beim Eindampfen auch auf das gebildete Kreatinin geltend und lieferte niedrigere Werte als bei Verwendung von nur 2,2%iger Salzsäure. Unsere Erfahrungen beim sauren Eindampfen der Organextrakte stimmen mit den Beobachtungen Jaffés,<sup>1)</sup> über die Umwandlung von Kreatin in Kreatinin im Harn überein. «Es war anzunehmen, daß die komplexe Zusammensetzung des Harns, welche der siedenden Säure zahlreiche Angriffspunkte liefert, das Kreatin vor der zerstörenden Einwirkung derselben schützt. Dies scheint in der Tat bis zu einem gewissen Grade wenigstens der Fall zu sein.»

In besonderen Versuchen wurde auch festgestellt, daß geringe Mengen der bei der Koagulation zurückbleibenden Albumosen und Peptone die Empfindlichkeit der Jafféschen Reaktion nicht störten; ebensowenig war die Anwesenheit geringer Mengen auskoagulierten Eiweißes von nachteiligem Einfluß, sofern vor

<sup>1)</sup> Jaffé, Diese Zeitschrift, Bd. LXVIII, S. 436.

Anstellung der kolorimetrischen Analyse von den ausgeschiedenen Flocken abfiltriert wurde.

### Autolyse-Versuche.

Mittels der geschilderten Methode, welche Kreatin und Kreatinin und die Summe beider Körper nebeneinander mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen gestattet, haben wir einige Fragen des Kreatinstoffwechsels näher verfolgt. Wir legten uns zunächst die Frage vor, ob Organpreßsäfte oder Organextrakte imstande sind, Kreatin in sein Anhydrid umzuwandeln.

Setzt man zu Blutserum, das durch Toluol vor Fäulnis geschützt ist, Kreatin hinzu und läßt das Gemisch einige Tage bei 37° stehen, so beobachtet man eine fortschreitende Zunahme des Kreatinins auf Kosten des zugesetzten Kreatins. Auch Blutserum ohne Kreatinzusatz zeigt eine geringe Vermehrung seines Kreatiningehaltes. Dieselbe fällt natürlich ungemein viel kleiner aus, als bei Kreatinzusatz. Bei der Schärfe der kolorimetrischen Bestimmungsmethode für diese kleinen Mengen läßt sich aber auch diese geringe Zunahme feststellen. Folgende Beispiele erläutern dies.

Aus dem angeführten Versuch 8 (S. 15), in welchem wir dem Serum Kreatin zusetzten, ergibt sich, daß bis 40,8% des vorhandenen umwandlungsfähigen Kreatins in sein Anhydrid umgewandelt sind. Aus der geringen Kreatinmenge des normalen Blutserums (Versuch 9) sind 11,1% in Kreatinin übergegangen.

In gleicher Weise ist auch bei der Autolyse der Organe eine deutliche Zunahme des Kreatinins nach Kreatinzusatz nachweisbar. Unsere Versuche darüber erstrecken sich auf Leber,<sup>1)</sup> Niere, Muskel, Darmschleimhaut von Hunden, Katzen

---

<sup>1)</sup> Die Kreatininbestimmung in autolysierten Leberextrakten mit Hilfe der Jafféschen Reaktion begegnet einigen Schwierigkeiten, weil die längere Zeit autolysierten Extraktlösungen mitunter auch ohne Zusatz alkalischer Pikrinsäure rote Farbnuancen geben. Dieser Mißstand wurde in der Weise gehoben, daß Extraktproben ohne Kreatin- oder Kreatinin-zusatz entsprechend lange Zeit bei 37° gehalten und die durch die rote Farbe dann vorgetäuschten Kreatininmengen festgestellt wurden. Durch Abzug dieser Werte von der Bestimmung der mit Kreatinin-zusatz autolysierten Leberextrakte wurden in den betreffenden Fällen die tatsächlichen Kreatinin-zahlen der Proben ermittelt.

## Verhalten von Hundebloodserum bei der Autolyse.

Versuch Nr. 8 mit Kreatinzusatz

» » 9 ohne »

Num- mer des Ver- suches	Hunde- blut- serum mit Toluol versetzt	Vorher vor- handenes Kreatin in Krea- tinin aus- gedrückt mg	Zugefügtes Kreatin		Dauer des Versuches	Gefun- denes Krea- tinin in mg	Kreatinin- Zunahme	
			in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt			in mg	in % des Krea- tins
8 a	Je 75 ccm Serum I + 50 ccm H <sub>2</sub> O	0,360	nichts zugefügt		sofort untersucht	0,435	—	—
b		0,360	125	107,85	49 Stund.	4,693	4,258	3,94
c		0,360	125	107,85	140 »	17,050	16,615	15,35
d		0,360	125	107,85	22 Tage	50,000	49,565	40,80
9 a	Je 75 ccm Serum II + 50 ccm H <sub>2</sub> O	1,921	nichts zugefügt		sofort untersucht	0,800	—	—
b		1,921	nichts zugefügt		90 Stunden	1,013	0,213	11,09

und Rindern und eine Reihe anderer Organe. Die Umwandlung erfolgt sowohl durch Preßsäfte als durch Organextrakte; letztere erwiesen sich sogar als wirksamer.

Zur Bereitung der Organextrakte wurden die Organe der Laboratoriumstiere sofort nach der Verblutung, bei Schlachthausmaterial möglichst bald in Arbeit genommen. Die Organe wurden fein zerhackt, mit Quarzsand innig verrieben und mit physiologischer Kochsalzlösung eine halbe Stunde durchgerührt. Durch Zentrifugieren wurden dann Sand und Gewebsteile von der Lösung getrennt, die, ohne weiter filtriert zu werden, zu den angeführten Versuchen verwendet wurde. Verzögerte sich die Bereitung oder Verwendung der Extrakte aus äußeren Gründen, so wurden dieselben mit Toluolzusatz bei Eistemperatur aufbewahrt.

Als Beispiel bringen wir folgenden Versuch mit Extrakt aus Katzenleber. (S. 16.)

Es haben sich im Versuch 10 in 144 Stunden 17% Kreatinin aus zugefügtem Kreatin gebildet. Aus einer Reihe von Versuchen, die zum Teil in den folgenden Tabellen niedergelegt sind, ergibt sich, daß die Kreatininbildung bei der Autolyse

schon nach wenigen Stunden beginnt. Zum Beispiel zeigte ein Extrakt aus Hundeniere (15 g Niere entsprechend) bei Zusatz von 25 mg Kreatin nach 14 Stunden eine Zunahme, die 12,5% des zugesetzten Kreatinins entsprach, und ein Extrakt aus Hundeleber (50 g Leber entsprechend) ergab nach 48 Stunden eine Kreatininvermehrung, die 24,5% des Kreatins gleichkam. Bei längerdauernder Autolyse konnten wir Kreatininzunahmen bis zu 40% des zugesetzten und vorhandenen Kreatins feststellen.

Verhalten eines Extraktes aus Katzenleber  
mit Kreatinzusatz bei 37°.

Num- mer des Ver- suches	Menge des ver- wendeten Extraktes	Zugefügtes Kreatin		Dauer des Versuches	Gefun- denes Krea- tinin in mg	Kreatinin- Zunahme	
		in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt			in mg	in % des Krea- tins
10 a	Je 20 ccm ent- sprechend 20 g	nichts zugefügt		sofort untersucht	Spuren	—	—
b		50	43,14	49 Stunden	4,822	4,822	11,18
c		50	43,14	144 »	7,448	7,448	17,26

Die Umwandlung von Kreatin in Kreatinin durch die Autolyse ist eine fermentative. Dafür spricht vor allem, daß kurzes Erhitzen der Extrakte auf höhere Temperatur diese Wirkung sehr stark abschwächt. Daß die Kreatininbildung nach dem Kochen der Extrakte nicht vollständig aufhört, sondern daß bei längerem Stehen auch in gekochten Extraktlösungen noch eine geringe Kreatininzunahme stattfindet, erklärt sich aus der anhydrierenden Wirkung, welche auch Wasser allein bei 37° auf Kreatin ausübt. Die Gegenwart von Säuren beschleunigt bekanntlich diese Veränderung, Doch ist es uns nicht wahrscheinlich, daß eine Säurewirkung bei unseren Autolyseversuchen eine Rolle spielte, denn die Organextrakte reagierten nach der Autolyse meist neutral; es mag dies damit zusammen-

hängen, daß bei der Autolyse entstehende Säuren durch das gleichzeitig gebildete Kreatinin neutralisiert werden und so die Aufhebung der Alkaleszenz durch die autolytische Säurebildung bei Kreatinzusatz hinausgeschoben wird.

In welchem Maße das Wasser bei 37° Kreatin in Kreatinin umzuwandeln vermag, zeigt folgende Tabelle.

Verhalten reiner mit Toluol versetzter Kreatinlösungen bei 37°.

Versuch Nr. 11.

Probe	Angewandte Menge Kreatin			Dauer der Aufbewahrung bei 37°	Gefundene Menge Kreatinin			
	in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt	in ccm Wasser gelöst		Kreatinin d. Aufbewahrung bei 37° gebildet		Gesamtbestimmung Kreatin + Kreatinin	
					in mg	in % des Kreatins	in mg	in %
a	12,5	10,785	15	24 Stund.	0	0	10,611	98,39
b	12,5	10,785	15	3 Tage	Spuren	0	10,770	99,86
c	12,5	10,785	15	6 »	0,3785	3,51	10,722	99,42
d	12,5	10,785	15	12 »	0,5794	5,37	10,668	98,92
e	12,5	10,785	15	24 »	1,0226	9,48	10,480	97,17
f	12,5	10,785	15	48 »	1,6008	14,84	10,535	97,68
g	12,5	10,785	15	121 »	2,5156	23,33	10,409	96,51

Vergleicht man damit die Wirkung erhitzten Blutserums oder erhitzter Organextrakte, so ist ersichtlich, daß die nach dem Erhitzen noch nachweisbare Umwandlung ihre Erklärung jedenfalls zum Teil in der Wirkung des Wassers finden kann; sicher aber bleibt diese Umwandlung gegen die Wirkung nicht erhitzter Lösungen weit zurück. Auch Erhitzen auf 60° schädigt schon.

## Wirkung erhitzten Blutserums.

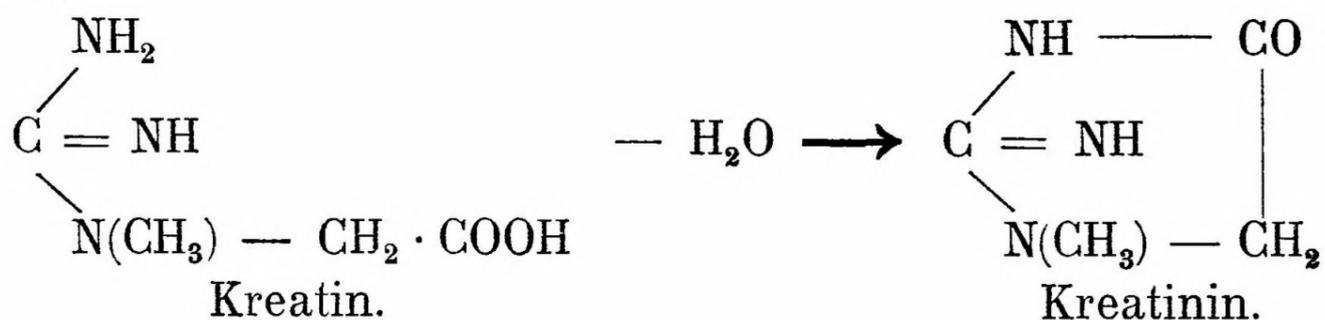
Num- mer des Ver- suches	Hunde- blut- serum mit Toluol versetzt	Vorher vor- handenes Kreatin in mg Kreatinin aus- gedrückt	Zugefügtes Kreatin		Dauer des Ver- suches	Gefun- denes Krea- tinin in mg	Kreatinin- zunahme	
			in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt			in mg	in % des Krea- tins
12 a	Je 50 ccm Serum III + 450 ccm H <sub>2</sub> O rasch auf- gekocht	1,882	nichts zugefügt		sofort untersucht	0,368	—	—
b		1,882	145,4	125,45	88 Stund.	3,750	3,382	2,66

## Wirkung erhitzter Organextrakte.

Num- mer des Ver- suches	Aufge- kochte Ex- trakte samt dem Koagulum von	Vorher vor- handenes Kreatin in mg Kreatinin aus- gedrückt	Zugefügtes Kreatin		Dauer des Ver- suches	Gefun- denes Krea- tinin in mg	Kreatinin- zunahme	
			in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt			in mg	in % des Krea- tins
13 a	Hunde- nieren Je 50 ccm Extrakt ent- sprechend 50 g Niere + 200 ccm H <sub>2</sub> O	2,007	nichts zugefügt		sofort untersucht	1,461	—	—
b		2,007	156,0	134,60	88 Stund.	4,038	2,577	1,84
14 a	Hunde- leber I Je 50 ccm Extrakt = 50 g Leber + 200 ccm H <sub>2</sub> O	1,621	nichts zugefügt		sofort untersucht	0,659	—	—
b		1,621	145,7	125,71	88 Stund.	2,596	1,937	1,21
15 a	Hunde- leber II Je 50 ccm Extrakt = 50 g Leber + 200 ccm H <sub>2</sub> O	nicht	125	107,85	sofort untersucht	2,957	—	—
b		untersucht	125	107,85	50 Stund.	4,176	1,219	1,13

Weiterhin läßt sich auch beweisen, daß das Ferment an gewisse Niederschläge gebunden wird. Durch Fällen der Eiweißkörper in den Extraktlösungen mit zwei Volumen Alkohol und einem Volumen Äther, Behandeln der abgesaugten Niederschläge mit Äther und Trocknen derselben im Vacuum über Schwefelsäure konnten Pulver erhalten werden, die ebenso wie die Organextrakte selbst auf Kreatin einwirkten. Durch fraktionierte Ammonsulfatfällung, sowie auch durch Uranylacetatfällung nach Rosell ließen sich mit dem bisherigen Material nur wenig wirksame Fermentlösungen gewinnen. Wir werden auf diese Versuche noch zurückkommen, nachdem wir die dem quantitativen Nachweis der Wirksamkeit dieser Fermentlösungen entgegenstehenden Schwierigkeiten — fermentative Zerstörung des gebildeten Kreatinins — besprochen haben.

Seiner Wirkung nach ist das Ferment als ein anhydrierendes zu bezeichnen. Die Reaktion verläuft nach folgender Gleichung:



Das Ferment scheint seine Wirksamkeit in schwach alkalischer, neutraler und schwach saurer Lösung zu entfalten; doch sind unsere Versuche über diesen Punkt noch nicht abgeschlossen.

Schon früher hatte Gérard<sup>1)</sup> eine Fermentwirkung bei der Umwandlung von Kreatin in Kreatinin der Niere zugeschrieben. Seine Experimente, auf die wir erst aufmerksam wurden, als unsere Versuche bereits abgeschlossen waren, sind jedoch nur qualitativer Art und sein Vorgehen zum Nachweis des Kreatinins (Phosphorwolframsäurefällung, Zerlegung usw.) schließt eine nachträgliche Umwandlung des Kreatins bei der Verarbeitung nicht aus. Ganz neuerdings hat auch Folin<sup>2)</sup> die fermentative Umwandlung als eine Vermutung geäußert.

Es entsteht die Frage, inwieweit der Nachweis des anhydrierenden Kreatinin bildenden Fermentes bei der Autolyse

<sup>1)</sup> Gérard, Compt. rend. 132, S. 153—155.

<sup>2)</sup> Folin, The Chemistry and Biochemistry of Kreatin and Kreatinin. Festschrift f. Olof Hammarsten. Upsala und Wiesbaden 1906.

imstande ist, die Bedingungen für den Übergang des Kreatins in sein Anhydrid *intra vitam* aufzuklären. In dieser Beziehung muß hervorgehoben werden, daß die ältere Auffassung, nach welcher der Übergang des einen Körpers in den anderen nur eine Funktion der Acidität oder Alkaleszenz des Mediums sein sollte, immerhin dem Verständnis der Tatsache Schwierigkeiten bietet, daß die Umwandlung des Kreatins in sein Anhydrid beim Fleischfresser so vollkommen erfolgt. Voit<sup>1)</sup> sagt in seiner grundlegenden Arbeit über den Kreatinstoffwechsel: «Man sieht nicht ein, auf welche Weise das Kreatin im alkalischen Blute sich in Kreatinin umwandeln sollte, da umgekehrt letzteres in alkalischer Lösung in Kreatin übergeht.» Deshalb verlegte Voit den Übergang des Kreatins in Kreatinin ausschließlich in das Nierengewebe. Aus den Versuchen über die Einwirkung der Säure im Reagenzglas (Jaffé, Folin) wissen wir heute, daß eine so schwache saure Reaktion, wie wir sie an einzelnen Stellen des sekretorischen Apparates der Niere annehmen dürfen (Dreser,<sup>2)</sup>) zu einer so vollkommenen Umwandlung nicht ausreicht. Dagegen würde die Annahme eines den Umwandlungsvorgang begünstigenden Fermentes die vorwiegende Kreatininausscheidung besser verständlich machen.

Vielleicht wird ein näheres Studium der die Fermentwirkung beherrschenden Bedingungen auch die Abhängigkeit der Kreatininausscheidung im Harne von der Reaktion desselben aufklären. Wenigstens konnten wir in vorläufigen Versuchen bereits nachweisen, daß das kreatininbildende Ferment in ganz schwach saurer Lösung am besten wirkt, aber schon durch geringe Alkaleszenz (0,3 ccm  $n/10$ -NaOH auf 20 ccm) in seiner Wirksamkeit deutlich geschädigt wird.

Bei der Autolyse läßt sich das kreatininbildende Ferment aber nicht bloß in der Niere, sondern auch im Blutserum und in allen untersuchten Organen nachweisen. Es stünde damit in Übereinstimmung, daß nach unseren Untersuchungen sich im Blut immer Kreatinin findet.

Ist nun das bei der Autolyse nachweisbare anhydrierende

---

<sup>1)</sup> Voit, Zeitschrift für Biologie, Bd. IV, S. 93.

<sup>2)</sup> Dreser, Zeitschrift für Biologie, Bd. XXI, S. 41, 1885.

Ferment auch *intra vitam* wirksam? Dafür spricht, daß wir den Übergang des Fermentes in den Harn nachweisen konnten. Es kommt nämlich auch dem Harn die Fähigkeit zu, bei längerem Stehen bei 37° zugesetztes oder präformiertes Kreatin in Kreatinin überzuführen.

Wir benutzten frisch gelassenen Menschenharn, der mit Toluol gesättigt und mit einer Toluolschicht bedeckt bei 37° mit oder ohne Kreatinzusatz aufbewahrt wurde. Nach verschiedener Zeit wurden mit der Pipette Proben von 10 bzw. 20 ccm entnommen und mit der Folinschen Methode der Kreatin- und Kreatiningehalt ermittelt.

Als Beispiel führen wir folgenden Versuch an:

Verhalten des Harnes mit Kreatininzusatz bei 37°.

Versuch Nr. 16.

Probe	Angewandte Menge Harn (Acidität 36,5) <sup>1)</sup> in ccm	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin in mg
		in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt		
a	10	nichts zugefügt		sofort untersucht	14,516
a'	10	»	»	» »	14,542
b	10	12,500	10,785	8 Stunden	15,024
c	10	12,500	10,785	48 »	16,920
d	10	12,500	10,785	144 »	17,495

In diesem Versuche hat sich innerhalb von fünf Tagen — in dieser Zeit war meistens das Maximum erreicht — zwar nur die Menge von 3 mg Kreatinin gebildet; bei der Feinheit der Folinschen Methode für den Nachweis so geringer Mengen geht diese Zunahme aber weit über die Fehlergrenze hinaus. Bedenkt man, daß dieses Plus von 3 mg sich in 10 ccm Harn gefunden hat, so erscheint das Umwandlungsvermögen des Harnes recht bedeutend. Größere Harnmengen zu untersuchen, hätte bei der von uns angewandten Methode keinen Sinn ge-

<sup>1)</sup> Wir drücken hier die Acidität durch die Anzahl Kubikzentimeter n/10-NaOH aus, die 100 ccm Harn zu ihrer Neutralisation bei Verwendung von Phenolphthalein Indikator verbrauchten.

habt, da dieselbe bei ganz kleinen Werten genau arbeitet, aber bei der Multiplikation zur Berechnung auf größere Mengen immer Fehler in sich birgt.

Es gelang auch das anhydrierende Ferment aus Harn mit Ammonsulfat niederzuschlagen.

In gekochtem Harn bildet sich hingegen Kreatinin nicht in höherem Maße, als der Wirkung des Wassers und der Acidität des Harnes entspricht.

Verhalten gekochten Harnes mit Kreatinzusatz bei 37°.

Versuch Nr. 19.

Probe	Angewandte Menge Harn (Acidität 24) in ccm	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin in mg
		in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt		
a	10	nichts zugesetzt		sofort untersucht	14,674
b	10	12,5	10,782	96 Stunden	15,140
c	10	12,5	10,782	192 »	15,639

Auch die Aufbewahrung des ungekochten Harns bei Eis-temperatur hält in Übereinstimmung mit der Annahme einer Fermentwirkung die Kreatininvermehrung auf.

Verhalten von Harn mit Kreatinzusatz bei 37 und bei 0°.

Versuch Nr. 20.

Probe	Angewandte Menge Harn in ccm	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin in mg
		in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt		
a	20	146,6	126,5	sofort untersucht	10,908
b	20	146,6	126,5	2 Std. bei 37°	11,947
c	20	146,6	126,5	2 » » 0°	10,843

Trotz des etwas komplizierten Verhaltens, welches Kreatin bei Zusatz zu Harn zeigt und auf das wir später noch ein-

zugehen haben, läßt sich somit in der ersten Zeit der Aufbewahrung bei 37° eine fermentative Umwandlung von Kreatin in Kreatinin nachweisen; quantitativ verhält sich dieselbe bei verschiedenen Harnen aber recht ungleich, da die Kreatininvermehrung in dem einen Harne schon nach wenigen Stunden, in dem anderen aber erst nach Tagen ihr Maximum erreicht.

Die Kreatininbildung aus zugesetztem oder präformiertem Kreatin läßt sich somit in unseren Versuchen auf Fermentwirkungen zurückführen. Das Ausmaß dieser Fermentwirkung läßt sich aber schwer erkennen, weil bei der Autolyse der Organe auch Kreatin aus unbekanntem Quellen gebildet, resp. aus höheren Atomkomplexen abgespalten wird,<sup>1)</sup> und weil ferner in Preßsäften und Organextrakten das entstandene Kreatinin durch die Autolyse in erheblichem Maße weiter zersetzt wird. Der ermittelte Kreatininwert ist somit kein wirkliches Maß der Kreatininbildung, sondern drückt immer nur aus, um wieviel die Bildung über die gleichzeitige Zerstörung des Kreatinins überwiegt.

Darnach gehen bei der Autolyse der Organe folgende Prozesse nebeneinander vor sich. 1. Kreatin oder Kreatininbildung, 2. Kreatin- resp. Kreatininzerstörung, 3. fermentative Umwandlung von Kreatin in Kreatinin. Aus dem Ineinandergreifen dieser drei Prozesse entsteht eine komplizierte Kurve des Kreatin- und Kreatiningehaltes der autolysierten Organe, Preßsäfte oder Extrakte.

Wir geben für den Verlauf dieser Kurve in folgenden Tabellen Beispiele, die sich auf das Verhalten von Muskelpreßsaft vom Stier mit und ohne Kreatinzusatz beziehen.

Die Preßsäfte wurden in der üblichen Weise mit Hilfe der Buchnerpresse hergestellt. Die von der Buchnerpresse abtropfende Flüssigkeit wurde in Eiskochsalzmischung gehalten und die zu den Versuchen abgemessenen Proben während der Autolyse durch reichlichen Toluolzusatz vor Fäulnis geschützt. Auch in den sofort verarbeiteten Proben von

---

<sup>1)</sup> Anmerkung bei der Korrektur: Die Arbeit von J. Seemann, Zeitschrift f. Biologie, Bd. XLIX, S. 333, die sich mit dieser Erscheinung bei Autolyseversuchen mit Muskel beschäftigt, erschien erst nach Ablieferung des Manuskripts und konnte daher nicht mehr berücksichtigt werden.

frischem Muskelfleisch erhielten wir immer nur wenig Kreatinin neben viel Kreatin und erst bei der Autolyse änderte sich dieses Verhältnis; wir erwähnen dies mit Rücksicht auf die Behauptung von Johnson,<sup>1)</sup> daß in frischem Fleisch neben wenig Kreatin viel Kreatinin vorkommt. Für die Herstellung aller Organextrakte, von denen im folgenden die Rede sein wird, gelten die schon oben über die Herstellung des Nierenextraktes gemachten Angaben.

Verhalten von Muskelpreßsaft ohne Kreatinzusatz  
bei 37°.

Versuch Nr. 21.

Probe	An- gewandte Menge Preßsaft in ccm	Zugefügtes Wasser in ccm	Dauer der Autolyse	Gefundenes Kreatinin	
				Kreatinin als solches in mg	Kreatin und Kreatinin zu- sammen in mg
a	5	nichts	sofort untersucht	2,708	—
a'	5	»	» »	2,800	19,286
b	5	5	114 Stunden	4,099	22,984
c	5	5	160 »	5,198	21,040
d	5	5	227 »	2,918	16,665
e	5	5	91 Tage	2,810	10,280

Verhalten von Muskelpreßsaft mit Kreatinzusatz bei 37°.

Versuch Nr. 22.

Probe	Menge Preß- saft in ccm	Kreatin- Zusatz		Wasser- Zusatz in ccm	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin	
		in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt			Krea- tinin als solches in mg	Kreatin und Kreatinin zusammen in mg
a	5	} nichts zugefügt	}	—	sofort untersucht	2,708	—
a'	5			—	» »	2,800	19,286
b	5	10	8,628	5	40 Stunden	3,874	—
b'	5	10	8,628	5	40 »	3,844	31,456
c	5	10	8,628	5	155 »	9,783	29,834
d	5	10	8,628	5	185 »	8,640	27,396
e	5	10	8,628	5	209 »	4,602	26,214
f	5	10	8,628	5	91 Tage	3,952	16,457

<sup>1)</sup> Johnson, Proceed. Royal Society, Bd. L, S. 28.

In den Versuchen zeigt sich sonach, daß sich bei der Autolyse von Muskelpreßsaft zunächst eine deutliche Zunahme des aus den Muskeln stammenden Gesamtwertes für Kreatin und Kreatinin ergibt; in den Versuchsbeispielen mit und ohne Kreatinzusatz beträgt dieselbe zufällig in beiden Fällen etwa 3—4 mg pro 5 ccm Preßsaft, ein in Anbetracht der Kleinheit der Proben beträchtlicher Zuwachs. In anderen Versuchen war derselbe sogar noch größer. Es scheint dabei auch von Bedeutung zu sein, ob die Autolyse bei Gegenwart von wenig oder viel Wasser vor sich geht. Dafür spricht der Vergleich des folgenden Versuches, der mit demselben Muskelpreßsaft der vorher angeführten Versuche, aber mit Zusatz von 10 ccm anstatt 5 ccm Wasser zu je 5 ccm Muskelpreßsaft angestellt ist.

Die Zunahme des Gesamtwertes an Kreatin und Kreatinin beträgt somit bei stärkerem Wasserzusatz ca. 11,5 mg pro 5 ccm Preßsaft gegenüber 3—4 mg bei geringerem Wasserzusatz. Es gehen dabei anscheinend nicht bloß die Gesamtwerte bei stärkerer Verdünnung in die Höhe, sondern entsprechend der größeren Kreatinbildung wird auch eine größere Menge in Kreatinin umgewandelt.

### Verhalten von Muskelpreßsaft mit Kreatinzusatz bei stärkerem Wasserzusatz.

#### Versuch Nr. 23.

Probe	Menge Preß- saft in ccm	Kreatin- Zusatz		Wasser- Zusatz in ccm	Dauer der Autolyse	Gefundenes Kreatinin	
		in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt			Krea- tinin als solches in mg	Kreatin und Kreatinin zusammen in mg
a	5	} nichts zugefügt		—	sofort untersucht	2,708	—
a'	5			—	» »	2,800	19,286
b	5	10	8,628	10	155 Stunden	11,350	39,512

Auch bei der Autolyse von Nierenpreßsaft zeigte sich eine Kreatinzunahme, vielleicht aber in weniger ausgeprägtem Maße. Es hat demnach den Anschein, als ob der Muskelpreßsaft (resp. Nierenpreßsaft) im Beginn der Autolyse Kreatin in komplizierterer Bindung enthielte, so daß dasselbe erst nach der Dauer der Autolyse von einigen Tagen im Filtrat des Koagulums reichlicher nachweisbar wird.

Es steht in Übereinstimmung mit dieser Annahme, daß man durch Koagulation und Nachwaschen mit heißem Wasser dem Muskelkoagulum nicht das gesamte Kreatin und Kreatinin entziehen kann. Ein geringer Anteil wird erst nach mehrstündigem Kochen, z. B. mit 2%iger Salzsäure, nachweisbar.

Diese Befunde erinnern an den kürzlich von Urano<sup>1)</sup> in dem physiologisch-chemischen Institute zu Straßburg erbrachten Nachweis, daß sich das Kreatin im Muskel zum großen Teile in einer nicht dialysablen Form findet, aus der es durch Kochen oder Zertrümmerung der Zellen in freies Kreatin übergeführt wird.

In unseren Versuchen könnte es sich allerdings auch um die Entstehung anderer reduzierender Substanzen bei der Autolyse handeln, da die angewandte Methode streng genommen nur das Vermögen, Pikrinsäure zu Pikraminsäure zu reduzieren, in den Lösungen bestimmt.

Versuche mit Organextrakten zeigen diese anfängliche Zunahme des Gesamtwertes von Kreatin und Kreatinin nicht. Dagegen trat sowohl in allen Preßsaftversuchen als auch bei der Autolyse der Organextrakte aus Leber, Niere, Nebenniere, Milz usw. ein weiterer Prozeß deutlich in Erscheinung, daß nämlich mit der Dauer der Autolyse eine fortschreitende Zerstörung präformierten oder zugesetzten Kreatins und Kreatinins stattfindet. Besonders schön zeigen dies Leber- und Nierenextrakte.

---

<sup>1)</sup> Urano, Hofmeisters Beiträge, Bd. IX, S. 104.

Verhalten von Nierenextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°  
(mit je 15 ccm entsprechend 15 g Niere vom Hund).

Versuch Nr. 24.

Probe	Kreatin-Zusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin					
	in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt		Krea- tinin als solches in mg	Kreatinin- Vermehrung		Kreatin und Krea- tinin zu- sammen in mg	Abnahme des Kreatin- + Kreatinin- wertes	
					in mg	in % d. Krea- tins		in mg	in %
a	nichts zugefügt		sofort untersucht	0	—	—	0	—	—
b	25	21,57	14 Stund.	2,705	2,705	12,54	4,091	4,091	18,97
c	25	21,57	178 »	ø	—	—	0	21,57	100,00

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°  
(mit je 50 ccm entsprechend 50 g Hundeleber).

Versuch Nr. 25.

Probe	Kreatin-Zusatz		Dauer der Autolyse	Gefundenes Kreatinin					
	in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt		Krea- tinin als solches in mg	Kreatinin- Vermehrung		Kreatin u. Krea- tinin zu- sammen in mg	Abnahme des Kreatin- + Kreatinin- wertes	
					in mg	in % d. Krea- tins		in mg	in %
a	nichts zugefügt		sofort untersucht	0,830	—	—	5,454	—	—
b	50	43,14	48 Stund.	12,536	11,706	24,51	21,148	27,446	56,47

Verhalten von Leberextrakt mit Kreatinzusatz bei 37°  
(mit je 20 ccm entsprechend 20 g Katzenleber).

Versuch Nr. 26.

Probe	Kreatin-Zusatz		Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin					
	in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt		Krea- tinin als solches in mg	Kreatinin- Vermehrung		Kreatin und Kreatinin zu- sammen in mg	Abnahme des Kreatin- und Kreatinin- wertes	
					in mg	in % des Krea- tins		in mg	in %
a	nichts zu- gefügt		sofort untersucht	Spu- ren	—	—	Spuren	—	—
b	50	43,14	49 Std.	4,822	4,822	11,18	38,572	4,568	10,59
c	50	43,14	144 Std.	7,448	7,448	17,26	20,558	12,582	29,17

Ein Vergleich vorstehender, sowie auch der früher angestellten Versuche zeigt, daß die Wirksamkeit der einzelnen Organe, auch abgesehen von individuellen Unterschieden, in quantitativer Hinsicht beträchtliche Unterschiede aufweist.

Über die Abbaustufen dieser Zerstörung des Kreatins können wir auf Grund unserer Versuche noch nichts aussagen. Es liegt aber die Frage nahe, ob der Abbau des Kreatins sich nicht vorzugsweise über sein Anhydrid vollzieht. Jedenfalls wird auch zugesetztes Kreatinin bei der Autolyse der Organextrakte zerstört, wie es scheint, im allgemeinen sogar noch in ausgiebigerem Maße. Wir bringen dazu folgende Versuche, bei denen wir salzsaures Kreatinin zusetzten, um bei Anwendung der freien Base die Alkaleszenz der Organextrakte nicht zu stark zu verändern.

### Verhalten von Nierenextrakten mit Kreatininzusatz<sup>1)</sup>

(mit je 50 ccm entsprechend 16 g Hundeniere).

#### Versuch Nr. 27.

Probe	Kreatinin Zusatz in mg	Dauer der Autolyse	Gefundenes Kreatinin		
			Kreatinin als solches in mg	Abnahme des Gesamtkreatinins	
				in mg	in % des Kreatinins
a	nichts zugefügt	sofort untersucht	0,487	—	—
b	20	48 Stunden	0,380	20,107	98,15

<sup>1)</sup> In dem Stab der Tabelle als freies Kreatinin berechnet.

Verhalten von Leberextrakten mit Kreatininzusatz<sup>1)</sup>

(mit je 50 ccm entsprechend 50 g Hundeleber).

Versuch Nr. 28.

Probe	Krea- tinin Zusatz in mg	Dauer der Autolyse	Gefundenes Kreatinin		
			Kreatinin als solches in mg	Abnahme des Gesamtkreatinins	
				in mg	in % des Kreatinins
a	nichts zugefügt	sofort untersucht	0,830	—	—
b	20	48 Stunden	0,108	20,722	99,48

Der Vergleich der Zerstörung von Kreatin und Kreatinin bei der Autolyse wird in unseren Versuchen allerdings dadurch erschwert, daß wir von dem wertvollen Kreatinin nur kleinere Mengen verwendet haben. Mit dieser Einschränkung können wir auf die stärkere Zerstörung des Kreatinins schließen.

Wir sind geneigt, ebenso wie die Umwandlung des Kreatins in Kreatinin auch die Zerstörung beider Körper auf eine Fermentwirkung zurückzuführen. Dafür spricht die Möglichkeit, wirksame Fermentniederschläge aus Organextrakten darzustellen. Am besten gelingt das durch Alkoholätherfällung; (zwei Drittel Alkohol, ein Drittel Äther). Die völlig trockenen Fermentniederschläge behielten längere Zeit ihre Wirksamkeit bei. Auch ein uns von Herrn Prof. Kossel freundlichst zur Verfügung gestelltes, lange Zeit aufbewahrtes Präparat von Arginase zeigte deutlich kreatinzerstörende Wirkung.<sup>2)</sup> Wir bringen für diese Versuche einige Beispiele in folgenden Tabellen.

<sup>1)</sup> In dem Stab der Tabelle als freies Kreatinin berechnet.

<sup>2)</sup> Längere Zeit, nachdem diese Untersuchungen ausgeführt waren, machte Achelis (Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 17) darauf aufmerksam, daß bei der Ähnlichkeit der Konstitution von Arginin und Kreatinin eine Untersuchung über die Wirkung der Arginase auf Kreatin und Kreatinin wünschenswert wäre.

Verhalten von Fermentlösungen aus Niere und Leber verschiedener Tiere mit Kreatinzusatz bei 37°.

Versuche Nr. 29—34.

Num- mer des Ver- suches	Fermentlösung aus:	Kreatinzusatz		Dauer des Ver- suches	Gefundenes Kreatinin					
		in mg	in mg Krea- tinin ausge- drückt		Kreatinin als solches in mg	Kreatinin- vermehrung in mg	in % des Kreatins	Kreatin u. Kreatinin zusam- men in mg	Abnahme des Kreatin- und Kreatininwertes in mg	in %
29	Hundeniere (Alk.-Äth.-Fällung) 1 g entsprechend 29 g Niere	75	64,71	92 Std.	1,951	1,951	3,02	6,311	58,399	90,52
30	Kalbsniere (Alk.-Äth.-Fällung) 2 g entsprechend 16 g Niere	75	64,71	91 »	0,779	0,779	1,21	2,025	62,685	96,87
31	Katzenniere (nach Rosell) Lösung reagierte neutral	50	43,14	89 »	1,518	1,518	3,52	25,572	17,568	40,72
32	Hundeleber (Alk.-Äth.-Fällung) 2 g entsprechend 26 g Leber	75	64,71	48 »	1,266	1,266	1,96	15,831	48,879	75,54
33	Katzenleber (Alk.-Äth.-Fällung) 2 g entsprechend 20 g Leber	75	64,71	17 Tage	1,185	1,185	1,83	6,975	57,735	89,22
34	Arginase 0,14 g	11	9,49	140 Std.	0,305	0,305	3,21	7,500	2,19	20,96

Besonders stark kreatinzerstörend wirkte ein Fermentpulver aus der Schilddrüse eines strumakranken Hundes.

Verhalten einer Fermentlösung aus der Hundeschilddrüse mit Kreatinzusatz bei 37°.

Versuch Nr. 35.

Fermentlösung aus Schilddrüse	Kreatin-Zusatz		Dauer des Versuches	Kreatinin gefunden					
	in mg	in mg Kreatinin ausgedrückt		Kreatinin als solches in mg	Kreatinin-Vermehrung		Kreatinin und Kreatinin zusammen in mg	Abnahme des Kreatin-u. Kreatininwertes	
					in mg	in % d. Kreatins		in mg	in %
1,75 g [Alk.-Äth.-Fällung] entsprechend 35 g Schilddrüse	75	64,71	48 Stund.	0,689	0,689	1,06	1,322	63,388	97,96

Ebenso wie Kreatin wird durch die Fermentlösungen auch Kreatinin zerstört. Dafür in folgendem Beispiele:

Verhalten von Fermentlösungen mit Kreatininzusatz bei 37°.

Nummer des Versuches	Fermentlösung aus	Kreatinin-Zusatz in mg	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin		
				Kreatinin als solches in mg	Abnahme des Kreatinins	
					in mg	in %
36	Katzenleber [Alk.-Äth.-Fällung] 2 g entspr. 20 g Leber	30	19 Tage	13,405	16,595	55,32
37	Arginase 0,19 g	40	282 Stund.	27,372	12,628	31,57

Aus den Beispielen geht hervor, daß sich nach den üblichen Methoden Fermentpulver darstellen lassen, welche Kreatin und

Kreatinin zerstören. Für die Fermentnatur dieses Vorganges kann angeführt werden, daß nach dem Aufkochen und der Koagulation des Organextraktes die fermentative Wirksamkeit des Filtrates aufgehoben ist. Das geringe Minus, das trotzdem zu erkennen ist, fällt in die Grenzen der Versuchsfehler, da der Nachweis des Kreatins mit der von uns gewählten Methode etwas größeren Fehlerquellen unterliegt, als die Bestimmung des Kreatinins. Bleibt dagegen das Koagulum in der Flüssigkeit suspendiert, und bleibt der weiteren Einwirkung der Kreatinlösung bei 37° ausgesetzt, so verschwindet anscheinend eine kleine Menge Kreatin; wahrscheinlich handelt es sich um eine Absorptionserscheinung; Kreatin wird im Koagulum festgehalten.

Für die Aufhebung der Kreatinzerstörung in den Organextrakten, dem Blutserum und den Fermentlösungen durch Siedehitze bringen wir die folgenden Beispiele in der Tabelle auf S. 34 und 35.

Auch die Fähigkeit der Organextrakte, Kreatinin zu zerstören, wird in gleicher Weise durch Kochhitze aufgehoben.

Verhalten eines Organextraktes nach Kreatininzusatz bei 37° (nicht gekocht und vorher gekocht)  
(mit je 50 ccm entsprechend 50 g Hundeleber).

Versuch Nr. 44.

Probe	Kreatinin- zusatz in mg	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin			Bemerkung
			Kreatinin als solches in mg	Kreatinin- abnahme		
				in mg	in %	
a	nichts zugefügt	sofort untersucht	0,830	—	—	
b	20	48 Stunden	0,108	20,722	99,48	
c	20	48 »	20,770	0,060	0,03	Erhitzter Extrakt; Koagulum entfernt.

Nach diesen Beobachtungen ist die Zerstörung von Kreatin und Kreatinin als eine Fermentwirkung anzusehen. Gegen

diesen Schluß könnte man einwenden, daß in unseren Versuchen größere Kreatinmengen nur in verhältnismäßig langer Zeit zerstört wurden (etwa 30—50 mg in 48 Stunden bis mehreren Tagen). Doch haben wir die maximale Leistungsfähigkeit des fermentativen Zerstörungsvorganges bisher nicht untersucht und zwar mit Rücksicht auf die angewandte Bestimmungsmethode, die gerade für den Nachweis kleiner Kreatininmengen geeignet ist. Um das Schicksal größerer Mengen festzustellen, hätten wir zum Zwecke der Bestimmung die Lösung nur um so stärker verdünnen müssen. Weiter aber ist an dieser Stelle hervorzuheben, daß wir auch die optimalen Bedingungen für die Wirksamkeit der Fermente noch nicht studiert haben. Wir haben uns damit begnügt, die fermentative Wirkung nachzuweisen, aber noch nicht untersucht, inwieweit Schütteln der Lösungen, Einleiten von Luft und Sauerstoff usw. die Wirksamkeit befördern und inwieweit die Gegenwart von Salzen, das von uns angewandte Antiseptikum Toluol und andere Umstände die Wirksamkeit schädigen. So hat sich z. B. herausgestellt, daß schon eine geringe Zunahme der Alkaleszenz sowohl die Tätigkeit des kreatininbildenden Fermentes als auch der Abbaufemente hemmt. Es kann also die relativ geringe Größe der beobachteten Veränderungen darauf beruhen, daß mit der fortschreitenden Entwicklung der starken Base Kreatinin die Bedingungen für die Tätigkeit der Fermente sich verschlechtern. Das Gesagte gilt auch für das anhydrierende, kreatininbildende Ferment. Bei demselben kommt aber zur Erklärung der relativ geringen Kreatininbildung noch ein zweiter Umstand in Betracht, daß nämlich in den gleichen Organextrakten und Fermentlösungen neben der Kreatininbildung immer auch die Zerstörung des Substrates für diesen Fermentvorgang — nämlich Kreatin — und die Zerstörung des Kreatinins einhergeht.

Die zerstörenden Fermente wären als Kreatase und Kreatinase zu bezeichnen. Sie sind nach unseren Beobachtungen in den Organen sehr verbreitet. Der Gehalt des Carotisblutes an diesen Abbaufementen ist dagegen verhältnismäßig gering, sodaß hier die Umwandlung von Kreatin in Kreatinin gegenüber der gleichzeitigen Zerstörung stärker hervortritt.

Verhalten von gekochten und nicht erhitzten Organen  
Versuch

Num- des Ver- suches	Material aus	Kreatinzusatz		Dauer des Versuches
		in mg	in mg Kreatinin ausge- drückt	
38 a	Hundeleber 50 ccm Extrakt entsprechend 50 g Leber	nichts	zugefügt	sofort untersucht
b	Dasselbe	50	43,14	48 Stunden
c	Dasselbe + 200 ccm H <sub>2</sub> O; erhitzt	50	43,14	48 »
39 a	Hundeniere 50 ccm Extrakt entsprechend 16 g Niere	nichts	zugefügt	sofort untersucht
b	Dasselbe	50	43,14	48 Stunden
c	Dasselbe + 200 ccm H <sub>2</sub> O; erhitzt	50	43,14	48 »
40 a	Hundeleber I 50 ccm Extrakt entsprechend 50 g Leber	nichts	zugefügt	sofort untersucht
b	Dasselbe + 450 ccm H <sub>2</sub> O; erhitzt	145,7	125,71	88 Stunden
41 a	Hundeleber II 50 ccm Extrakt entsprechend 50 g Leber + 450 ccm H <sub>2</sub> O; erhitzt	125	107,85	sofort untersucht
b	Dasselbe; erhitzt	125	107,85	50 Stunden
42 a	Hundeblutserum 50 ccm Serum	nichts	zugefügt	sofort untersucht
b	Dasselbe + 450 ccm H <sub>2</sub> O; erhitzt	145,4	125,45	88 Stunden
43 a	Fermentlösung aus Hundeleber (Alkohol-Äther-Fällung) 2 g entsprechend 26 g Leber	75	64,71	48 »
b	Dasselbe + 125 ccm H <sub>2</sub> O; erhitzt	170,6	146,78	66 »

extrakten und Fermentlösungen mit Kreatinzusatz.  
Nr. 38—43.

Kreatinin als solches in mg	Kreatinin- vermehrung		Kreatin und Kreatinin zusammen in mg	Abnahme des Kreatin-u.Kreatinin- wertes		Bemerkungen
	in mg	in % des Kreatins		in mg	in %	
0,830	—	—	5,454	—	—	
12,536	11,706	24,51	21,148	27,446	56,47	
0,972	0,142	0,03	48,460	0,134	0,03	ohne Koagulum
0,487	—	—	1,156	—	—	
7,010	6,523	14,89	15,728	28,568	64,49	
0,507	0,020	0	44,200	0,096	0,02	ohne Koagulum
0,659	—	—	2,280	—	—	
2,596	1,937	1,21	116,550	11,40	8,94	mit Koagulum
2,957	—	—	101,250	—	—	mit Koagulum
4,176	1,219	1,24 <sup>1)</sup>	98,440	2,810	2,78 <sup>1)</sup>	mit Koagulum
0,368	—	—	2,250	—	—	
3,750	3,382	2,66	120,900	6,800	5,33	mit Koagulum
1,266	1,266	1,96	15,831	48,879	75,54	
0,494	0,494	0,34	146,007	0,773	0,53	

1) Auf die sub a ermittelte, umwandlungsfähige Substanz bezogen.

So betrug in einem Falle, wo wir 75 ccm Blutserum vom Hunde bei Zusatz von 125 mg Kreatin und Toluol autolysierten, die Vermehrung an Kreatinin nach 140 Stunden rund 15% vom umwandlungsfähigen Kreatin, die Zerstörung dagegen in der gleichen Zeit nur ca. 8% des vorhandenen Kreatins und Kreatinins; bei Verlängerung der Autolyse auf 22 Tage hatten sich dann 40,8% Kreatinin gebildet, während nur 17,2% der beiden Körper zerstört wurden. Eine Trennung des kreatininbildenden Fermentes von der Kreatase und Kreatinase ist uns bisher noch nicht geglückt, doch haben wir Andeutungen dafür, daß eine solche Trennung möglich sein wird.

Die zerstörenden Fermente gehen auch in den Harn über, woraus wir auf ihre Bedeutung für den Stoffwechsel der lebenden Organe schließen können. Neben der Fähigkeit, Kreatin in Kreatinin umzuwandeln, besitzt der Harn auch ein deutlich nachweisbares Zerstörungsvermögen für beide Körper. Die allmähliche Abnahme des Kreatins und Kreatinins ist in toluolgesättigtem Harne bei 37° nach längerem Stehen erkennbar und zwar auch ohne Zusatz weiteren Kreatins. Ein Beispiel dafür gibt folgender Versuch.

Verhalten nativen Harnes ohne Kreatinzusatz bei 37°.

Versuch Nr. 45.

Probe	Angewandte Menge Harn [Acidität 39] in ccm	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin	
			Kreatinin als solches in mg	Kreatin u. Kreatinin zusammen in mg
a	10	26 Stunden	16,233	16,008
b	10	50 »	14,808	—
c	10	171 »	12,385	14,595
d	10	320 »	11,686	—

Bei den zur Untersuchung verwendeten kleinen Harnproben sind zwar die absoluten Werte der Kreatin- oder Kreatininabnahme gering; berechnet man diese Abnahme jedoch auf

die ganze Tagesmenge des Harnes, so erscheint sie nicht unerheblich. Die Tatsache, daß die Kreatininbestimmungen im Harn nach längerem Stehen, auch wenn er vor Fäulnis geschützt ist, durch das Wirken des anhydrierenden, kreatininbildenden Fermentes und der Abbaufemente verändert ausfallen, ist von methodischer Wichtigkeit. So erklären sich die Unterschiede der Kreatininzahlen des Harnes, wie sie z. B. aus den Tabellen von van Hoogenhuyze und Verploegh<sup>1)</sup> ersichtlich sind, dadurch, daß diese Zahlen sowohl durch Untersuchung von Proben aus dem Sammelharn eines Tages ermittelt als auch durch Summieren der in den einzelnen frischen Harnportionen gefundenen Werte berechnet wurden.

In weiterem bringen wir einen Versuch mit neutralisiertem Harn. Derselbe war gegen Phenolphthalein durch  $n/10$ -Natronlauge neutral gestellt.

Verhalten nativen, neutralisierten Harnes bei 37°.

Versuch Nr. 46.

Probe	Angewandte Menge Harn in ccm	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin	
			Kreatinin als solches in mg	Kreatin u. Kreatinin zusammen in mg
a	10	sofort untersucht	7,980	8,359
b	10	72 Stunden	7,903	—
c	10	119 »	7,284	—
d	10	286 »	6,480	6,728

Vergleicht man nun das Verhalten neutralisierten nativen Harnes mit einer zweiten Probe, die vor der Neutralisation gekocht wurde, so zeigt sich, daß ein großer — wenn nicht der größte — Anteil des Zerstörungsvermögens verloren gegangen ist. In Übereinstimmung mit der Annahme eines fermentativen Vorganges steht auch die bedeutende Verlangsamung der Umwandlung durch Eisschranktemperatur.

<sup>1)</sup> Van Hoogenhuyze u. Verploegh, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, Tab. auf S. 444 ff.

Verhalten gekochten, neutralisierten<sup>1)</sup> Harnes bei 37°.

## Versuch Nr. 47.

Probe	Angewandte Menge Harn in ccm	Dauer des Versuches	Gefundenes Kreatinin	
			Kreatinin als solches in mg	Kreatin u. Krea- tinin zusammen in mg
a	10	sofort untersucht	13,235	12,832
b	10	69 Stunden	12,181	—
c	10	116 »	10,640	—
d	10	282 »	10,135	—
e	10	378 »	9,902	11,912

Daß auch in gekochten Harnen noch geringe Veränderungen des Kreatin- und Kreatiningehaltes, wenn auch in geringerem Grade auftreten, hängt mit Ursachen zusammen, die wir nicht näher verfolgt haben, ist aber bei der komplexen Zusammensetzung des Harnes auch ohne Annahme fermentativer Vorgänge erklärlich. So hat kürzlich Dakin<sup>2)</sup> auf die Möglichkeit hingewiesen, daß oxydierende Agentien im Harn eine Entstehung von Glyoxylsäure aus Kreatinin veranlassen.

Die Gegenwart der nachgewiesenen Fermente kann eine wichtige Rolle im Kreatininstoffwechsel spielen. Ihr Nachweis bei der Autolyse und im Harn macht es wahrscheinlich, daß auch intra vitam neben der Kreatinbildung in den Organen eine fermentative Umwandlung des Kreatins in Kreatinin sowie eine Zerstörung beider Körper einhergeht. In Übereinstimmung mit der allgemeinen Verbreitung des kreatininbildenden Fermentes in den Organen sowie auch im Blute läßt sich z. B. mittels der Folinschen Nachweismethode in frischem Aderlaßblute der untersuchten Tierarten auch immer Kreatinin neben Kreatin

<sup>1)</sup> Da mit der Dauer des Versuches eine Kreatininabnahme bei nur geringer Veränderung des Gesamtwertes an Kreatin plus Kreatinin zu verzeichnen ist, wird wohl ein Übergang von Kreatinin in Kreatin bei der nur als relativ zu bezeichnenden Phenolphthaleinneutralität des Harnes stattgefunden haben.

<sup>2)</sup> Dakin, Journal of Biological chemistry, Bd. I, S. 271, 1906.

nachweisen, was bekanntlich früher<sup>1)</sup> bestritten wurde. So fanden wir im Hunde- und Katzenblute Kreatinin neben Kreatin. Diesbezügliche Werte sind in folgender Tabelle angeführt.

Gehalt frischen Tierblutes an Kreatin und Kreatinin.

Nummer des Versuches	Frisches defibriniertes Carotisblut von	100 ccm Blut enthalten		
		Kreatinin  mg	Kreatin	
			in Kreatinin ausgedrückt mg	als Kreatin berechnet mg
48	Zwei weibl. jungen Katzen [Mischblut]	0,85	2,11	2,44
49	Jungem weiblichen Hund	0,72	1,33	1,54
50	Erwachsenem männlichen Hund	0,38	2,52	2,92

Nimmt man die Tätigkeit der Kreatin- und Kreatinin abbauenden Fermente in den lebenden Organen an, so haben wir kein Recht mehr zu der Annahme, daß die Muskeln soviel reichlicher Kreatin bilden als andere Organe, weil in ihnen soviel mehr Kreatin zu finden ist. Es könnte auch in anderen Organen eine reichlichere Kreatinbildung vor sich gehen, als man bisher annahm, aber die Bedingungen für den Abbau des entstandenen Kreatins könnten in jenen Organen günstigere sein, die, wie z. B. die Leber, verhältnismäßig leicht Kreatinin zerstören.

Bei der Betrachtung des Gesamtstoffwechsels gibt ferner unter der Annahme einer neben der Kreatinbildung einhergehenden fermentativen Zerstörung die Menge des im Harne erscheinenden Kreatins und Kreatinins keinen Maßstab mehr ab für die Größe des Kreatinstoffwechsels. Ähnlich wie bei der Harnsäure können wir auch beim Kreatin Bildung und Zerstörung in den einzelnen Organen nebeneinander nachweisen. In dem einen Organ könnte die Bildung von Kreatin, in dem anderen die Zerstörung vorherrschend sein.

<sup>1)</sup> Voit, Zeitschrift für Biologie, Bd. IV, S. 98.

Über den Umfang der Kreatinbildung können wir aber aus der Menge des im Harn ausgeschiedenen Kreatins nichts schließen; denn es könnten viel größere Mengen von Kreatin in dem Gesamtstoffwechsel entstanden, aber auch wieder zerstört worden sein. Analog dem Verhalten der Harnsäure erscheint auch ein mit der Nahrung dargereichtes Plus von Kreatin nur zum Teil im Harn wieder; die endogen im Stoffwechsel entstandenen Körper könnten aber am Orte ihrer Bildung vollständiger zerstört werden, als bei ihrer Zuführung von außen. Speziell das bei der Muskeltätigkeit freiwerdende Kreatin könnte mit der Abnahme der Alkaleszenz im arbeitenden Muskel besonders günstige Bedingungen für seine Umwandlung in Kreatinin und für seine Zerstörung finden.

Die Vorgänge des Kreatinstoffwechsels stellen sich sonach bei der Annahme intracellulärer kreatinbildender und kreatinzerstörender Fermente als recht komplizierte dar. Weitere Untersuchungen müssen erst näheren Aufschluß über den Ort und die Art des Kreatinabbaues ergeben.

Bei der Feinheit des Nachweises kleiner Mengen mittels der Folinschen Methode erscheint es uns möglich, einen Einblick in die Topographie des Kreatinstoffwechsels auch durch Untersuchung des aus den einzelnen Organen abströmenden Blutes und einen Vergleich mit dem zuströmenden zu gewinnen. Wir haben solche Untersuchungen bereits begonnen.

Weiterhin ist zu hoffen, daß es auch gelingen wird, durch fermentativen Abbau des Kreatins in den Organen die Zwischenprodukte dieser Zerstörung im Organismus kennen zu lernen.

Die wesentlichen Ergebnisse vorliegender Arbeit lassen sich dahin zusammenfassen:

1. Bei der Autolyse des Muskels und anderer Organe wird im Beginn Kreatin gebildet. (Preßsaftversuche.)
2. Vorhandenes und zugesetztes Kreatin werden bei der Autolyse durch einen Fermentvorgang (anhydrierendes kreatininbildendes Ferment) zum Teil in Kreatinin umgewandelt.
3. Kreatin und Kreatinin werden mit fortschreitender Autolyse durch abbauende Fermente (Kreatase und Kreatinase) zerstört.

4. Aus dem Ineinandergreifen dieser Vorgänge ergibt sich eine komplizierte Kurve für die Kreatin- und Kreatininwerte autolysierter Organextrakte und Preßsäfte, da nebeneinander Kreatinbildung, Umwandlung in Kreatinin und Zerstörung beider Körper anzunehmen sind. Je nach dem Vorwalten des einen oder anderen Vorganges unterscheidet sich das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse der verschiedenen Organe.

5. Die nachgewiesenen Fermentwirkungen sind auch im Harne zu erkennen.

