

Beiträge zur Muskelchemie.

II. Mitteilung.

Der Stickstoff einiger Extraktivstoffe und der Purinbasen in der glatten, der quergestreiften und der Herzmuskulatur der Säugetiere.

Von

G. Buglia und A. Costantino.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Neapel.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. August 1912.)

In Fortsetzung unserer Studien über die Chemie der glatten und quergestreiften Muskulatur der Säugetiere haben wir Bestimmungen des Kreatins, des Carnosins und der Purinbasen gemacht, indem wir uns desselben Materials bedienten, das schon zu unseren früher publizierten Untersuchungen¹⁾ gedient hatte.

Wir waren der Meinung, daß diese Bestimmungen von Nutzen sein würden, obwohl die Literatur über zahlreiche Daten, speziell über den Stickstoff des Kreatins und der Purinbasen der quergestreiften Säugetiermuskulatur verfügt. Dagegen sind die Angaben über die glatte Muskulatur verhältnismäßig gering und nicht immer vergleichbar mit den erstgenannten, besonders weil die Bestimmungen nicht an Material von demselben Tiere gemacht worden sind, noch weniger aber an einem Material, was anatomisch so rein ist wie das des Muskels des retractor penis.

A. Kreatininstickstoff.

In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben über den Kreatin- und Kreatiningehalt der quergestreiften Muskulatur der höheren Tiere.²⁾

¹⁾ G. Buglia und A. Costantino, Diese Zeitschr., I. Mitteilung.

²⁾ O. v. Fürth, Chemie des Muskelgewebes. In C. Oppenheim, Handb. d. Biochem., Bd. 2, S. 271, 1909.

Unter den neueren Angaben sei an die von Monari,¹⁾ Hoogenhuyze,²⁾ Mellamby,³⁾ Pekelharing⁴⁾ und v. Fürth⁵⁾ erinnert:

Autoren	Minimal- und Maximalwerte des Kreatininstickstoffs des quergestreiften Muskels in %
Monari	0,12—0,16
Hoogenhuyze	0,12—0,15
Mellamby	0,11—0,16
Pekelharing	0,11—0,18
v. Fürth	0,10—0,12

O. v. Fürth und C. Schwarz⁶⁾ bestimmten auch den Kreatininstickstoff des Pferdeherzmuskels und fanden in Prozenten die Werte 0,0729—0,0778.

Was die glatte Muskulatur anlangt, so wurden einige Bestimmungen an niederen Tieren ausgeführt, dagegen existieren wenige Daten für die glatte Muskulatur der Säugetiere. Unter letzteren sind diejenigen von Saiki⁷⁾ am Magen und der Blase des Schweines gemachten zu erwähnen:

	Kreatinin in % des Muskels
Magen	0,079—0,093
Blase	0,078—

In bezug auf die Extraktion des Kreatins und Kreatinins aus dem Muskelbrei folgten wir der von Mellamby⁸⁾ angegebenen Arbeitsweise. Der Muskelbrei, im Gewicht von 40

¹⁾ A. Monari, Atti R. Accad. delle Scienze di Torino, Bd. 22, S. 846, 1887.

²⁾ J. C. van Hoogenhuyze und H. Verploegh, Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 415, 1905.

³⁾ E. Mellamby, Journ. of Physiol., Bd. 36, S. 447, 1907—08.

⁴⁾ C. A. Pekelharing und C. S. C. van Hoogenhuyze, Diese Zeitschrift, Bd. 64, S. 262, 1910.

⁵⁾ O. v. Fürth und C. Schwarz, Bioch. Zeitschr., Bd. 30, S. 413, 1911.

⁶⁾ O. v. Fürth und C. Schwarz, l. c.

⁷⁾ T. Saiki, Journ. of Biol. Chem., Bd. 4, S. 483, 1908.

⁸⁾ C. Mellamby, Journ. of Pysiol., Bd. 36, S. 447, 1907—08.

bis 60 g, wurde zunächst mit 95%igem Alkohol behandelt und auf Leinwand abfiltriert. Das Residuum wurde hierauf abgepreßt und viermal mit heißem Wasser ausgezogen. Jede Extraktion dauerte $\frac{1}{2}$ Stunde, wobei geschüttelt wurde. Zuletzt wurde der Rückstand wieder auf Leinwand abgepreßt und die alkoholischen und wässerigen Extrakte auf dem Wasserbad zur Trockene gebracht. Dieser Trockenrückstand wurde mit heißem 75%igem Alkohol aufgenommen, wobei Kreatin und Kreatinin in Lösung gehen, während die Eiweißsubstanzen zurückbleiben. Der Alkohol wurde vertrieben und dann mit Wasser aufgenommen und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Nach dem Filtrieren wurden 10—20 ccm der Lösung zur kolorimetrischen Bestimmung des Kreatinins nach Folin benutzt; in gleicher Weise wurde zur Bestimmung des Kreatins verfahren, nachdem dasselbe zunächst durch 3—4 stündiges Erhitzen mit n_{11} -HCl auf dem Wasserbad invertiert worden war.

Unsere Resultate sind in der folgenden Tabelle vereinigt:

Muskel	Prozent der Muskelsubstanz			
	Kreatinin in g (vor der Inversion)	Kreatinin in g (nach der Inversion)	Kreatinin-N (nach der Inversion)	
Glatt (retractor penis)	0,0657	0,092	0,097	0,036
	0,0813	0,094		
	0,0709	0,105		
		0,097		
		0,097		
Quer- gestreift	0,225	0,325	0,315	0,117
	0,231	0,306		
	0,243			
Herz	0,141	0,214	0,214	0,079
	0,161	0,215		

Hieraus geht hervor, daß der Betrag des Kreatinins im glatten Muskel der Säugetiere um ca. $\frac{1}{3}$ geringer ist als im quergestreiften Muskel. Der Herzmuskel enthält dagegen etwas über die Hälfte mehr im Vergleich zum quergestreiften Muskel. Auch bei Betrachtung der von uns erhaltenen mittleren Werte

für den Kreatininstickstoff im Vergleich mit dem Gesamtstickstoff in den verschiedenen Arten von Muskeln ergibt sich die Übereinstimmung mit den obgenannten Verhältnissen.

Muskel	Gesamtstickstoff nach Kjeldahl in % des Muskels	Kreatininstickstoff (nach Inversion) in % des Gesamtstickstoffs
Retractor penis (glatt) .	2,90	1,24
Quergestreift	3,40	3,44
Herzmuskel	2,77	2,85

B. Purinstickstoff:

Burian¹⁾ erhielt bei Bestimmung des Gesamtpurinbasenstickstoffs in der quergestreiften Muskulatur des Ochsen den Wert 0,06—0,07, ausgedrückt in Prozenten.

Scaffidi²⁾ erhielt für den Froschmuskel den Wert 0,035, für den Krötenmuskel 0,022.

Letztgenannter Autor bestimmte später auch vergleichsweise den Purinstickstoff des quergestreiften, des Herzmuskels und des glatten Muskels (retractor penis) des Stiers. Seine Resultate³⁾ sind die folgenden:

Muskel	Purinstickstoff in %
Quergestreift	0,0611
Herz	0,0707
Glatt	0,0339

Bei unseren Bestimmungen des Purinstickstoffs befolgten wir die Methode des korrigierten Wertes von Burian und Hall.⁴⁾ Die zur Aufschließung des Muskelbreies verwandte Schwefelsäure war 1%ig, und die für jede Bestimmung verwandte Menge Muskelsubstanz betrug 80—90 g.

Wir erhielten folgende Werte:

¹⁾ R. Burian und Walker Hall, Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 336, 1903.

²⁾ V. Scaffidi, Biochem. Zeitschr., Bd. 30, S. 473, 1911.

³⁾ V. Scaffidi, Biochem. Zeitschr., Bd. 33, S. 217, 1911.

⁴⁾ l. c.

Purinstickstoff in Prozenten der Muskelsubstanz.

Glatter Muskel (retractor penis)	Quergestreifter Muskel	Herzmuskel
0,052	0,072	
0,0523	0,065	0,085
0,048	0,068	
0,0482		
0,0441		
0,0489	0,068	

Diese Tabelle zeigt, daß die von uns für den quergestreiften Muskel gefundenen Werte für den Purinbasenstickstoff mit den von Burian und Hall gefundenen übereinstimmen.

Die Werte von Scaffidi für den quergestreiften, den glatten und den Herzmuskel sind dagegen alle ein wenig niedriger als die unsrigen; möglicherweise, weil genannter Autor für den Gesamtpurinstickstoff die Summe des Stickstoffs aus freien Purinbasen plus gebundenen Purinbasen gibt. Auf jeden Fall ist die Differenz zwischen den Purinbasen der verschiedenen Muskelarten die gleiche wie bei unseren Daten.

Den größten Purinbasengehalt hat der Herzmuskel, hierauf folgt der quergestreifte Muskel und zuletzt der glatte Muskel. Die gleichen Unterschiede findet man bei Betrachtung der Beziehungen zwischen Purinstickstoff und Gesamtstickstoff der verschiedenen Muskelsorten:

Muskel	Gesamtstickstoff in % des Muskels	Purinstickstoff in % des Gesamtstickstoffs
Glatt	2,90	1,68
Quergestreift . . .	3,40	2,00
Herz	2,77	3,06

In weiteren Versuchen beabsichtigen wir den Purinbasenstickstoff der glatten Muskulatur in qualitativer Hinsicht zu studieren.

C. Carnosinstickstoff:

Hand in Hand mit den Bestimmungen des Kreatinin- und Purinstickstoffs haben wir auch Bestimmungen des Carnosin-

stickstoffs der drei Muskelsorten ausgeführt. Die von uns gewählte Arbeitsmethodik läßt sich allerdings kritisieren, umso mehr, als wir uns auf Stickstoffbestimmungen beschränkt haben, die in derjenigen Fraktion der Extraktivstoffe ausgeführt wurden, in der Gulewitsch und Amiradzibi¹⁾ die Gegenwart des Carnosins nachwiesen.

Wenn demnach die angeführten Werte im absoluten Sinne nicht volles Zutrauen verdienen können, indem sich außer dem Carnosinstickstoff noch der Stickstoff anderer Substanzen dieser Fraktion darin finden könnte, so haben dieselben immerhin Bedeutung bei vergleichenden Studien. Umsomehr dürfte dies der Fall sein, wenn man den Stickstoffwert genannter Fraktion für die quergestreifte Muskulatur in Beziehung zum Stickstoff anderer Extraktivstoffe bringt.

O. v. Fürth und Schwarz,²⁾ die sich neuerdings derselben Methode bedienen, haben besonders auf die Wichtigkeit genannter Substanz für den Stoffwechsel hingewiesen. Als Normalwert für den quergestreiften Muskel (Pferd und Hund) fanden genannte Autoren 0,105—0,117% Carnosinstickstoff, für den Herzmuskel ergab sich dagegen der Wert 0,086—0,109. Diese Werte sind jedoch etwas höher als diejenigen anderer Experimentatoren, welche das Carnosin direkt bestimmten. So fand Krimberg³⁾ 0,3% und Skworzow⁴⁾ 0,44% auf frischen Muskel berechnet.

Die Methode, deren wir uns zur Bestimmung des Stickstoffs der sogenannten Carnosinbestimmung bedienen, war die folgende:

Der 120—140 g betragende Muskelbrei wurde des öfteren (3—4 mal) mit kochendem Wasser ausgezogen, so daß man eine Flüssigkeitsmenge von ca. 800 ccm erhielt. Diese wurde filtriert und im Wasserbad auf ca. 60 ccm konzentriert und dann mit 30%igem neutralen Bleiacetat gefällt.

¹⁾ W. Gulewitsch und S. Amiradzibi, Diese Zeitschrift, Bd. 30, S. 565, 1900.

²⁾ O. v. Fürth und C. Schwarz, l. c.

³⁾ R. Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 412, 1906.

⁴⁾ W. L. Skworzow, Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 26, 1910.

Die abgesaugte Fällung wurde mit kaltem Wasser gewaschen und das Filtrat zur Entfernung des Bleies mit Schwefelsäure versetzt und dann auf dem Wasserbad auf ca. 10 ccm eingeengt. Zu dieser Flüssigkeit fügt man 20%ige Silbernitratlösung, um die Purinbasen zu entfernen, worauf das Filtrat von neuem mit Silbernitrat versetzt wird, und zwar bis ein Probetropfen mit einem Tropfen Barytlösung nicht mehr einen weißen, sondern einen gelblichen Niederschlag erzeugt, und zwar unter sofortiger Bildung einer braunen Färbung. War dies der Fall, so wurde der Flüssigkeit sofort ein Überschuß konzentrierter heißer Barytlösung zugesetzt. Der erzeugte Niederschlag wurde sodann auf einem aschefreien Filter gesammelt, gut mit Wasser gewaschen und darin der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Einige Male wurde auch der bei 70—80° getrocknete und feingepulverte Muskel verwendet, und zwar ausschließlich bei der glatten Muskulatur, die außerordentlich stark opalescente Extrakte liefert, die sich selbst nur wenig nach Behandlung mit Bleiacetat klären. Wir haben die Extraktion in diesem Falle nach der von uns anderen Ortes beschriebenen Weise ausgeführt, wie wir sie für Bestimmung der freien Aminosäuren angegeben haben.¹⁾ Wir machen jedoch darauf aufmerksam, daß, da man bei der Extraktion des Trockenpulvers nach Zufügung des Baryts (das Chlorbaryum wird durch Baryumnitrat ersetzt) eine stark alkalische Flüssigkeit erhält, es zweckmäßig ist, Kohlensäure einzuleiten, um den Baryt zu entfernen, und zwar bis nahezu zur Neutralität, dann aber mit Salpetersäure zu neutralisieren.

Um uns von der Brauchbarkeit der Trockenpulver-Extraktion auch für die vorliegende Art von Versuchen zu überzeugen, haben wir zwei Bestimmungen an demselben Muskel (Herzmuskel) ausgeführt, die eine am frischen Muskel, die andere am Trockenpulver. Beide stimmten überein.

Die von uns erhaltenen Werte für den Stickstoff der Carnosinfraktion des quergestreiften, des glatten und des Herzmuskels sind in folgender Tabelle vereint. Neben der Berech-

¹⁾ G. Buglia und A. Costantino, Diese Zeitschr., III. Mitteilung.

nung auf 100 g Muskel finden sich auch die Angaben bezogen auf 100 g Gesamtstickstoff.

Muskel	Gesamt-N (Kjeldahl) in % des Muskels	Carnosin-N in % des Muskels	Carnosin-N in % des Gesamt-N
Glatt (retractor penis)	2,90	0,036	1,24
Quergestreift	3,40	0,105	3,08
Herz	2,77	0,045 0,044 } 0,0445	1,60

Hieraus ergibt sich, daß die glatte Muskulatur den niedrigsten Wert für den Carnosinstickstoff liefert, während die quergestreiften Muskeln die höchsten Werte zeigen. Die Zahl für den Carnosinstickstoff des Herzmuskels nähert sich mehr der des glatten Muskels als der des quergestreiften.

In einer früheren Mitteilung¹⁾ haben wir gleichzeitig mit Bestimmungen des durch Formol titrierbaren Gesamtamidostickstoffs auch Bestimmungen des Gesamtstickstoffs und des durch Formol titrierbaren Amidostickstoffs des Stromas und des extrahierbaren Myoproteins sowohl der glatten als der quergestreiften Muskulatur gemacht. Es scheint uns nun, daß die Beziehungen zwischen dem Stickstoff der Extraktivstoffe und der Purinbasen und dem Stickstoff der extrahierbaren Myoproteine erhöhtes Interesse bieten dürften als diejenigen Bestimmungen, welche nicht die Beziehungen zwischen dem Stickstoff genannter Substanzen und dem Gesamtstickstoff der Muskelsubstanzen geben. Wir geben deshalb die für das Kreatinin, Carnosin und die Purinbasen, als auch für den Stickstoff der extrahierbaren Myoproteine gefundenen Werte wieder, indem wir daran auch die schon früher publizierten²⁾ Daten über den Gehalt der verschiedenen Muskelarten an freien Aminosäuren hinzufügen.

¹⁾ G. Buglia und A. Costantino, Diese Zeitschr., I. Mitteilung.

²⁾ l. c.

Prozent der ursprünglichen quergestreiften Muskulatur.

Muskel	Gehalt an Proteinen		Gesamt-N des extrahier- baren Myo- proteins	Krea- tinin- N in %	N der Carnosin- fraktion in % des extrahier- baren Myo- protein-N	Purin-N in % des extrahier- baren Myo- protein-N	N der ge- samt freien Amino- säuren in % des extrahier- baren Myo- protein-N
	Extrahier- bare Myo- proteine in g (getrock- net bei 100°)	Proteine des «Stroma» (getrock- net bei 100°)					
Glatt	7,96	10,78	1,27	2,82	2,82	3,91	3,58
Quer- gestreift	12,17	5,06	1,94	6,02	5,41	3,50	2,99

Bei Betrachtung dieser Tabelle beobachtet man, daß der Kreatinstickstoff und der Stickstoff der Carnosinfraktion bezogen auf 100 g Stickstoff extrahierbaren Myoproteins in den glatten Muskeln bedeutend niedriger ist, als in den quergestreiften Muskeln, nur um wenig niedriger jedoch, wenn man denselben vergleicht mit Gesamtstickstoff der Muskulatur in toto.

Setzt man dagegen den Stickstoff der Purinbasen und der freien Aminosäuren in Beziehung zu 100 g Stickstoff der extrahierbaren Myoproteine, so zeigt sich derselbe größer in den glatten Muskeln als in quergestreiften Muskeln. Bezieht man ihn hingegen auf den Gesamtstickstoff des frischen Muskels oder auch auf 100 g frische Muskelsubstanz, so findet man, daß sowohl die Purinbasen als auch die freien Aminosäuren in der quergestreiften Muskulatur vorwiegen.

Die Unterschiede zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur hinsichtlich des Stickstoffs der Extraktivstoffe, der Purinbasen und der Aminosäuren variieren demnach, je nachdem man denselben auf frische Muskelsubstanz oder auf den Gesamtstickstoff des Muskels oder den der extrahierbaren Myoproteine bezieht.

Setzt man den für 100 g glatte Muskulatur gefundenen Stickstoffwert der Extraktivstoffe und der Purinbasen gleich eins, und andererseits auch den Stickstoffwert genannter Substanzen gleich eins, jedoch in Beziehung zu 100 g Gesamtstickstoff oder zu 100 g Stickstoff des extrahierbaren Myoproteins,

so ergeben sich für glatte und quergestreifte Muskulatur folgende Relationen:

Stickstoff	In % des Muskels		In % des Gesamt-N		In % des N der extrahierbaren Myoproteine	
	glatter Muskel	quer- gestreifter Muskel	glatter Muskel	quer- gestreifter Muskel	glatter Muskel	quer- gestreifter Muskel
des Kreatinins	1	3,2	1	2,7	1	2,1
der Carnosin- fraktion	1	2,9	1	2,4	1	1,9
der Purinbasen	1	1,4	1	1,1	1	0,9
der freien Amino- säuren	1	1,2	1	1,1	1	0,8

Diese Daten zeigen, daß wir im glatten Muskel die geringsten Carnosinmengen finden, im quergestreiften hingegen die höchsten. Der Carnosingehalt des Herzmuskels nähert sich mehr dem der glatten Muskulatur.