

Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln.

XV. Mitteilung.

Über das Vorkommen des Carnosins, Methylguanidins und Carnitins im Pferdefleisch.

Von
J. Smorodinzew.

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

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juli 1913.)

Nachdem es festgestellt worden war, daß die zuerst aus dem Liebigschen Fleischextrakt isolierten Stoffe: Carnosin,¹⁾ Methylguanidin²⁾ und Carnitin³⁾ auch im frischen Rindfleisch⁴⁾ vorkommen, kam natürlicherweise die Frage nach dem Vorhandensein der genannten Verbindungen in andern Organen und Geweben sowie nach dem Grad ihrer Verbreitung in der Muskulatur anderer Tiere an die Reihe. Die genannten Basen wurden auch im Kalbfleisch⁵⁾ gefunden, das Carnosin wurde aus dem Fleische von einigen Fischen, Krabben und Austern⁶⁾ und von wildem Kaninchen⁷⁾ gewonnen. Das Carnosin und Carnitin sind jedoch bislang nur im Muskelfleisch konstatiert worden; die Untersuchung anderer Organe: der Niere,⁸⁾ der

¹⁾ Wl. Gulewitsch und S. Amiradžibi, Diese Zeitschrift, Bd. 30, S. 565 (1900).

²⁾ Fr. Kutscher, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm., Bd. 10, S. 531 (1906); Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 471 (1906).

³⁾ Wl. Gulewitsch und R. Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 45, S. 326 (1905).

⁴⁾ R. Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 412 (1906).

⁵⁾ W. Skworzow, Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 36 (1910).

⁶⁾ U. Suzuki, K. Yoshimura, M. Jamakawa und J. Irie, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 1 (1909); U. Suzuki, Chem. Zentralbl., 1913, I, S. 1042.

⁷⁾ K. Yoshimura, Bioch. Zs., Bd. 37, S. 477 (1911).

⁸⁾ K. Bebeschin, Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 380 (1911).

Leber,¹⁾ auf das Vorhandensein dieser Verbindungen hat negative Resultate ergeben, während das Methylguanidin auch als einer der Bestandteile der Leber sich erwiesen hat.¹⁾

Erste Untersuchung.

6,5 kg Muskeln vom Hinterbein eines frisch getöteten Pferdes²⁾ wurden auf die gewöhnliche Weise behandelt.³⁾ Aus der Fraktion des Silberniederschlags wurden 0,58 g freie Purinkörper isoliert, welche durch ihr Verhalten gegen eine ammoniakalische Silbernitratlösung, gegen die Xanthinprobe und gegen die Weidelsche Probe identifiziert wurden.

Die Fraktion des I. Silberbarytniederschlags gab 2,0 g freien Carnosins mit der Zersetzungstemperatur 239 bis 242°.⁴⁾

II. Silberbarytniederschlag. Es wurden 8,97 g salpetersauren Methylguanidins und aus der nichtkrystallisierenden Mutterlauge desselben noch 2,37 g pikrinsauren Methylguanidins gewonnen. Das umkrystallisierte Methylguanidinnitrat zeigte den richtigen Schmelzpunkt 149—150°,⁵⁾ das umkrystallisierte Pikrat schmolz bei 201,5°, d. h. hatte den Schmelzpunkt des reinen Methylguanidinpikrates.⁵⁾

Wismutjodidniederschlag lieferte 5,65 g einer Sublimatverbindung, welche in Gestalt gut ausgebildeter, zu Kugeln vereinigter kleiner Nadeln mit dem Schmelzpunkt 196° krystallisierte; das Carnitinquecksilberchloriddoppelsalz $C_7H_{15}NO_3$, $2 HgCl_2$ schmilzt genau bei 196°.⁶⁾

¹⁾ J. Smorodinzew, Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 218 (1912).

²⁾ Das Material zu dieser und zu der zweiten Untersuchung wurde vom bakteriologischen Institut des Herrn Dr. Ph. Blumenthal überlassen, dem ich hiermit meinen innigsten Dank ausspreche.

³⁾ H. Thierfelder, Hoppe-Seylers Handbuch d. physiol. und pathol.-chem. Anal., 1909, S. 758.

⁴⁾ Einen Teil dieser Untersuchung, und zwar bis zum Moment der Gewinnung der Carnosinfraktion führte ich unter der Mitwirkung von weiland Fr. E. Polikarpow aus. Infolge der plötzlichen Erkrankung und des Todes meiner Mitarbeiterin ging ein bedeutender Teil dieser Fraktion verloren.

⁵⁾ Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 471 (1905).

⁶⁾ R. Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 363 (1907).

Zweite Untersuchung.

Da aus dem oben erwähnten Grunde die Carnosinfraktion in der ersten Untersuchung verloren gegangen war, so wiederholte ich meine Arbeit, doch mit dem Unterschied, daß ich Wechsler's¹⁾ Hinweis auf die Löslichkeit der Phosphorwolframate der organischen Basen in Acetonwasser behufs Trennung derselben von den amorphen, die Krystallisation verhindernden Verunreinigungen benutzte.

Aus 18 kg ganz frischen Pferdefleisches (vom Hinterbein) wurde auf die gewöhnliche Weise ein wässriges Extrakt bereitet: das mit der Fleischhackmaschine feingewiegte Fleisch wurde in kochendes Wasser gebracht und das Erwärmen bei ca. 90° 20—30 Minuten fortgesetzt. Nachdem diese Operation dreimal wiederholt worden war, wurden 78 l so erhaltenen Extraktes bis auf 2¹/₂ l eingengt und unmittelbar ohne Ausäuerung und ohne vorhergehende Fällung mit Bleiacetat,²⁾ mit einer konzentrierten Phosphorwolframsäurelösung gefällt, wozu ca. 1 kg krystallinische Phosphorwolframsäure erforderlich war. Der erhaltene voluminöse Niederschlag wurde mittels Dekantieren und Absaugen ausgewaschen und dann mit Acetonwasser (4 Teile Aceton auf 3 Teile Wasser) im Mörser verrieben, die Operation wurde dreimal wiederholt; es wurden im ganzen 3,6 l Acetonwasser verbraucht. Der im Acetonwasser aufgelöste Teil der Phosphorwolframate (A) wurde von dem ungelöst gebliebenen (B) getrennt.

Phosphorwolframat A.

Die in Acetonwasser gelösten Phosphorwolframate wurden von der Phosphorwolframsäure durch eine warme konzentrierte Baryhydratlösung befreit, darauf die alkalische Reaktion des Filtrats zum Teil durch Zusatz von Schwefelsäure und definitiv durch einen Kohlensäurestrom aufgehoben. Beim Abdampfen wurde die amphotere Reaktion durch Zusatz von Salpetersäure aufrechterhalten. Nach der Einengung bis auf ca. 50—60 ccm

¹⁾ E. Wechsler, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 138 (1911).

²⁾ J. Smorodinzew, Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 230 (1912).

und der Abkühlung krystallisierte die Flüssigkeit durchwegs aus. Die abgesaugten und mit verdünntem Weingeist ausgewaschenen Krystalle wogen 10,44 g. Die verhältnismäßig großen, glasartigen, prismatischen Krystalle verloren beim Erwärmen auf dem Wasserbade ihren Glanz und nahmen ein porzellanartiges Aussehen an; nach dem Erwärmen auf dem Wasserbade mit verdünnter Schwefelsäure gaben sie bei den Proben nach Jaffé, Weyl und Salkowski ein positives Resultat, was ein klarer Beweis dafür ist, daß die erhaltenen Krystalle aus Kreatin bestanden.

Silberniederschlag. Aus der Mutterlauge des auskrystallisierten Kreatins wurden 0,75 g freier Purinkörper ausgeschieden und durch entsprechende Reaktionen identifiziert.

I. Silberbarytniederschlag. Auf die gewöhnliche Weise erhielt ich ca. 10 g rohes Carnosinnitrat, welches bei der ersten Umkrystallisation in einige Fraktionen zerfiel, die insgesamt 6,66 g wogen und deren Zersetzungstemperatur = 208—213° war. Die Mutterlauge, welche keine Krystalle ausgeschieden hätte, zeigte Rechtsdrehung; folglich konnte hier keine größere Menge linksdrehender Substanz (vgl. S. 7) beigemischt sein. Der zweimal umkrystallisierte Stoff, der bei 220° unter Zersetzung schmolz, diente zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens.¹⁾

I. 1,3348 g Substanz wurden in Wasser zu 16,6504 g gelöst (die Wägungen sind auf die Luftleere reduziert); $p = 8,02\%$; $c = 8,26\%$ (d ist = 1,0303 angenommen²⁾); $\alpha_D^{17,5} = +1,850^\circ$ bei $l = 1$ dm. Aus diesen Werten wird $[\alpha]_D = +22,4^\circ$ berechnet, während für ganz reines salpetersaures Carnosin $[\alpha]_D = +22,8^\circ$ bei $c = 8,240\%$ ³⁾ ist.

Die aus der polarisierten Lösung auskrystallisierte Substanz, die ebenfalls bei 220° schmolz, diente zur Bestimmung des Stickstoffs.

¹⁾ Sowohl diese als auch alle anderen in dieser Arbeit angeführten polarimetrischen und krystallographischen Untersuchungen wurden lebenswürdigerweise von Herrn Professor Dr. Wl. Gulewitsch ausgeführt, wofür ich ihm hier meinen tiefsten Dank ausspreche.

²⁾ Wl. Gulewitsch, vorige Mitteilung, die Beobachtungen IV u. XI.

³⁾ Wl. Gulewitsch, vorige Mitteilung, die Beobachtung IV.

II. 1,0831 g der lufttrockenen Substanz verloren im Vakuum-exsikkator 0,0022 g; folglich enthielt sie kein Krystallwasser.

III. 0,1192 g der getrockneten Substanz gaben 25,5 ccm N bei 17° und 754 mm Bar.

Gefunden:	Berechnet
III.	$C_9H_{14}N_4O_3 \cdot HNO_3$:
N = 24,41%	24,26%

Die Bestimmungen des Stickstoffs, des Krystallwassers, des Schmelzpunktes und besonders des spezifischen Drehungsvermögens zeigen somit, daß die untersuchte Substanz unzweifelhaft das salpetersaure Salz des Carnosins vorstellte.

Aus dem zweiten Silberbarytniederschlag wurden auf die gewöhnliche Weise 1,21 g salpetersauren Methylguanidins mit dem Schmelzpunkt 150° isoliert und aus der Mutterlauge 1,20 g eines Pikrats erhalten, welches bei 198—200°, und noch 4,0 g einer anderen Pikratfraktion, welche bei 162—172° schmolz. Beim Umkrystallisieren der ersten Pikratfraktion stieg der Schmelzpunkt bis auf 201,5°. ¹⁾ Ein Teil dieser umkrystallisierten Fraktion wurde zur Stickstoffbestimmung benutzt.

IV. 0,1212 g der bei 105° getrockneten Substanz gaben 30,5 ccm N bei 20° und 746 mm Bar.

Gefunden:	Berechnet
IV.	$C_2H_7N_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$:
N = 28,01%	27,82%

Somit erwies sich die analysierte Substanz als das Methylguanidinpikrat.

Die zweite Pikratfraktion wurde dreimal aus heißem Wasser umkrystallisiert, wobei der Zersetzungspunkt 179—186° resp. 179—183° resp. 179—183° aufgefunden wurde. Obgleich die Substanz viel niedriger wie das Methylguanidinpikrat schmolz, zeigte die Untersuchung unter dem Polarisationsmikroskop unzweifelhaft die Identität dieses Pikrates mit dem des Methylguanidins.

Wismutjodidniederschlag. Hier wurden 5,63 g einer Sublimatverbindung erhalten, welche beim Umkrystallisieren vier Fraktionen mit dem Schmelzpunkt 194—197° gab. Ein Teil einer reineren Fraktion (Schmelzpunkt 196—197°) wurde

¹⁾ Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 471 (1906).

in das Chloraurat übergeführt, welches bei 154—156° schmolz. Bei der Untersuchung unter dem Polarisationsmikroskop zeigten die Krystalle eine parallele Auslöschung und waren der Länge nach positiv; dieselben krystallographischen Eigenschaften besitzt das Chloraurat des Carnitins.¹⁾

V. 0,1768 g des bei 105° getrockneten Chloraurats ließen beim Glühen 0,0698 g Au zurück.

Gefunden:	Berechnet für
V.	$C_7H_{16}NO_3 \cdot AuCl_4$:
Au = 39,47%	39,35%

Der Schmelzpunkt der Sublimat- und der Goldverbindung, die krystallographischen Eigenschaften und der Goldgehalt beweisen das Vorhandensein von Carnitin in der untersuchten Substanz.

Wismutjodidfiltrat. Aus dieser Fraktion wurden ebenfalls gegen 3,0 g einer Sublimatverbindung erhalten, wobei die eine Portion der Krystalle bei 167—170°, die andere bei 189—191° schmolz; dieselben wurden vermischt und in Chloraurat verwandelt, welches bei 152—153° schmolz. Folglich war ein Teil des Carnitins bei der Fällung mit Wismutnatriumjodid im Filtrat zurückgeblieben.

Phosphorwolframat B.

Kreatin wurde hier nicht gefunden. Im Silberniederschlag wurden 0,57 g freier Purinkörper aufgefunden.

I. Silberbarytniederschlag. Die freie Base wurde auf die gewöhnliche Weise in einer Menge von ca. 25 g auskristallisiert. Die Form der Krystalle und der Zersetzungspunkt (238—239°) erinnerte an Carnosin; zu unserm Erstaunen erwies sich jedoch die Lösung linksdrehend: die Lösung, welche die Gesamtmenge der Substanz enthielt und 200 ccm betrug, zeigte bei $l = 1 \text{ dm } [\alpha]_D = -1,74^\circ$. Unmittelbar aus Wasser wurden in 6 Fraktionen 9,6 g schwach gelblicher Substanz mit der Zersetzungstemperatur 237—241° auskristallisiert, während aus der Mutterlauge absoluter Alkohol noch 10,4 g einer gelblichen bei 210—225° schmelzenden Substanz ausschied. Die

¹⁾ R. Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 370 (1907).

heiße wässrige Lösung dieses Niederschlags wurde mit heißem Alkohol bis zur schwachen Trübung versetzt. Man ließ die Flüssigkeit sich langsam abkühlen, goß die wässrig-alkoholische Lösung vorsichtig von dem Öl, welches sich abgeschieden hatte, ab und fiel, wie oben beschrieben, aufs neue mit Alkohol. Auf diese Weise wurden 6 Ölfractionen erhalten, die sich als linksdrehend erwiesen haben. Die Fractionen 7 und 8 fielen krystallinisch aus.¹⁾ Sie schmolzen bei 234—237° resp. 226° und wurden zu den 9,6 g der reineren Fraction (S. 17) zugegeben. Behufs Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens wurden diese drei vereinigten Fractionen dreimal umkrystallisiert; die Zersetzungstemperatur der umkrystallisierten Substanz war 239—242°, folglich etwas niedriger als die des reinen Carnosins.²⁾

VI. Eine wässrige Lösung der Substanz zeigte bei $c = 12,831\%$ $\alpha_D^{17} = +2,165^\circ$ bei $l = 1$ dm. Daraus wird $[\alpha]_D = +16,9^\circ$ berechnet, während für ganz reines Carnosin $[\alpha]_D = +21,0^\circ$ bei $c = 12,925\%$ ³⁾ ist.

Aus der Lösung, welche zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens gedient hatte, wurde die Base zur Analyse auskrystallisiert; die Zersetzungstemperatur der erhaltenen Substanz war = 242—243°.

VII. 0,1141 g der im Vakuumexsikkator getrockneten Substanz gaben 24,8 ccm N bei 18° und 756 mm Bar.

Gefunden:	Berechnet für
VII.	$C_9H_{14}N_4O_3$:
N = 24,76%	24,78%.

Der Stickstoffgehalt und die Zersetzungstemperatur zeigen, daß die gefundene Base Carnosin ist; die Abweichung in der Größe der spezifischen Drehung erklärt sich durch die Gegenwart einer gewissen Menge einer stark linksdrehenden Substanz (vgl. S. 17), von der das Carnosin sogar durch die dreimalige Krystallisation nicht zu befreien war. Die Untersuchung dieser unbekanntes Substanz ist in Angriff genommen.

¹⁾ Nach dem 9. und 10. Alkoholzusatz fiel ein optisch inaktives Öl aus.

²⁾ Wl. Gulewitsch, vorige Mitteilung, S. 8.

³⁾ Wl. Gulewitsch, vorige Mitteilung, die Beobachtung XX.

II. Silberbarytniederschlag. Da es nicht gelungen war, das hier vermutete Methylguanidinnitrat auszukristallisieren, so führte ich es in das Pikrat über, welches auch nicht kristallisierte. Durch Fällung mit absolutem Alkohol wurden 2,13 g einer Substanz erhalten; der Versuch, dieselbe aus Wasser oder verdünntem Alkohol auszukristallisieren, blieb aber erfolglos.

Wismutjodidniederschlag und -filtrat. Es wurden 5,74 g einer Sublimatverbindung erhalten, welche in eine Goldverbindung übergeführt wurde; das Goldsalz konnte weder aus Wasser noch aus dem mit Äther versetzten Alkohol auskristallisiert werden.

Somit wurde aus dem Phosphorwolframat **B** nur ein kleiner Teil von Purinkörpern und eine ziemlich große Menge Carnosin ausgeschieden; in den übrigen Fraktionen wurde nichts Bestimmtes gefunden. Wenn die Behandlung der Phosphorwolframate mit Acetonwasser gute Resultate im Sinne einer besseren Krystallisation der Produkte, deren Phosphorwolframate in die Acetonlösung übergegangen sind, liefert, so scheint andererseits der Teil der Phosphorwolframate der Basen, welcher nicht Zeit genug gehabt hat, sich im Acetonwasser aufzulösen, durch die Beimengung nichtkrystallisierbarer Stoffe sich in seinen Eigenschaften soweit zu verändern, daß er in krystallinischer Gestalt nicht mehr erhalten werden kann; dadurch dürfte sich der bedeutende Unterschied in der Quantität des Methylguanidins in der ersten und der zweiten Fleischportion (0,083 % gegen 0,011 %) erklären. Wechsler (l. c.) weist ebenfalls auf die Unmöglichkeit hin, das Methylguanidin durch dieses Verfahren genau zu bestimmen. Was das Carnosin anbetrifft, so löste sich das Phosphorwolframat des reinen Präparats in Acetonwasser fast momentan, während beim Extrahieren des aus dem Fleisch gewonnenen Gemisches von verschiedenen Phosphorwolframaten ein großer Teil des Carnosinphosphorwolframats sogar nach einer längeren Einwirkung dieses Lösungsmittels ungelöst blieb (ca. 80 %: von 33—25 g). Es dürfte sich hier schwer ein Kriterium für die nötige Dauer des Extrahierens aufstellen lassen; bei gar zu langer Einwirkung des Acetonwassers können unkrystallisier-

bare Beimengungen in die Lösung übergehen und die Krystallisation der reinen Produkte erschweren, so daß diese Behandlung keinen Zweck mehr haben würde.

Wie aus untenstehender Tabelle ersichtlich ist, entsprechen die von mir gefundenen Carnosin-, Carnitin- und Methylguanidinnengen ungefähr den von andern Autoren für die Muskeln verschiedener Tiere angeführten Zahlen. Was die Menge der Purinkörper anbetrifft, so hat diese Methode, wie ich schon zu bemerken Gelegenheit gehabt, ¹⁾ nicht den Zweck, dieselben quantitativ vollständig auszuschneiden.

1 kg frischer Muskeln enthält
in g

	Pferd	Rind ²⁾	Lachs ³⁾	Maguro ³⁾	Kalb ⁴⁾	Wildes ⁵⁾ Kaninchen	Schwein ⁶⁾
Kreatin	— 0,58	—	3,2	3,0	—	2,0	—
Purinkörper	0,09 0,07	—	—	—	—	0,04	—
Carnosin	— 1,82	1,30	0,55	2,0	1,76	2,23	1,95
Methylguanidin	0,83 0,11	—	—	—	0,22	—	—
Carnitin	0,2 0,17	—	—	—	0,19	—	0,3

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 227 (1912).

²⁾ R. Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 412 (1906).

³⁾ U. Suzuki, K. Yoshimura, M. Jamakawa und J. Irie, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 34 (1909).

⁴⁾ W. Skworzow, Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 369 (1910).

⁵⁾ K. Yoshimura, Biochem. Zs., Bd. 37, S. 481 (1911).

⁶⁾ Aus meiner nicht veröffentlichten Arbeit.

Berichtigung

zu der Mitteilung von J. Smorodinzew.

Band 80, S. 226, Zeile 12 von oben lies:

22,3 ccm statt 23,3 ccm.