

Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln.

Über das Kreatosin, eine neue Base des Fleischextraktes.

Von

R. Krimberg und Leonid Izraïlsky.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. Oktober 1913.)

Bekanntlich hat man während der letzten Jahre aus dem Fleischextrakte mehrere neue Bestandteile gewonnen, unter welchen besonders das Carnosin,¹⁾ das Carnitin²⁾ und das Methylguanidin³⁾ zu nennen sind. Ursprünglich aus dem Liebigs Fleischextrakte isoliert, konnten diese zurzeit recht wohlcharakterisierten Körper demnächst auch in ganz frischem Muskelfleisch aufgefunden werden. Nachdem der eine von uns gezeigt hatte, daß die genannten Basen alle drei in frischem Rindfleisch enthalten sind,⁴⁾ hat man die Anwesenheit derselben bis jetzt auch im Kalb-⁵⁾ und Pferdefleisch⁶⁾ konstatieren können; das Carnosin allein ist aus dem Fleische von einigen Fischen, von Krabben und Austern,⁷⁾ sowie von wilden Kaninchen⁸⁾ isoliert worden. Die Gewinnung des Carnosins, des Carnitins und des Methylguanidins aus dem Fleischextrakte geschieht am bequemsten nach der von Herrn Prof. Wl. v. Gulewitsch und unter seiner Leitung von einem der Verfasser

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

²⁾ Wl. Gulewitsch und R. Krimberg, Diese Zeitschr., Bd. 45. S. 326 (1905).

³⁾ Fr. Kutscher, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm., Bd. 10, S. 531 (1906); Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 471 (1906).

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

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

⁶⁾ J. Smorodinzew, Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 12 (1913).

⁷⁾ U. Suzuki, K. Joshimura, M. Jamakawa und J. Irie, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 1 (1909); U. Suzuki, Chem. Zentralbl., 1913, I. S. 1042.

⁸⁾ K. Joshimura, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, S. 477 (1911).

ausgearbeiteten Methode,¹⁾ welche gestattet, diese Körper alle aus ein und derselben Portion des Extraktes zu erhalten.

Mit den neuerdings hinzugekommenen Bestandteilen ist die Zahl der tatsächlich existierenden Extraktivstoffe der Muskeln jedoch noch nicht erschöpft. Unter Anwendung einer verhältnismäßig einfachen Methode, welche von der oben erwähnten in mehreren Momenten wesentlich abweicht, ist es uns gelungen, noch zwei weitere basische Bestandteile aus dem Fleischextrakte zu isolieren. Über den einen derselben, für welchen wir den Namen «Kreatosin» vorschlagen, soll hier kurz berichtet werden. Das Verfahren, dessen wir uns bedient haben, und durch welches es ermöglicht wird, die neuen Körper in ziemlich guter Ausbeute in die Hände zu bekommen, ist das folgende.

Eine konzentrierte Lösung von Liebigs Fleischextrakt wird mit 20%igem neutralem Bleiacetat unter Vermeidung eines größeren Überschusses desselben ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt und gewaschen; das Waschwasser wird gesammelt, stark eingeengt und mit dem Hauptfiltrat vereinigt. Die mit Schwefelsäure bis zu etwa 5 vol.%ig gemischte Flüssigkeit wird nun ohne vorherige Filtration mit Phosphorwolframsäure (1 : 1) vollständig ausgefällt. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank wird der Niederschlag abgesaugt, mit etwa 3 vol.%iger Schwefelsäure sorgfältig gewaschen und mit Baryumhydroxyd auf die übliche Weise zerlegt. Der entstandene Niederschlag von Baryumphosphorwolframat wird abgesaugt und gewaschen. Die Filtrate werden sofort mit Schwefelsäure neutralisiert, vom Baryumsulfat befreit, und zuletzt vereinigt unter Zusatz von Tierkohle bei streng neutraler Reaktion bis zur Trockne eingedampft. Der schwarze Rückstand wird nun in derselben Porzellanschale wiederholt mit neuen Portionen 95%igen Alkohols unter tüchtigem Rühren

¹⁾ Hoppe-Seylers Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-chemischen Analyse. Bearbeitet von H. Thierfelder. Achte Auflage, Berlin 1909, S. 758.

Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden. Herausgegeben von Prof. Dr. Emil Abderhalden. Zweiter Band, S. 1049. Berlin-Wien 1910.

und Kneten der Masse ausgekocht. Die erhaltenen Auszüge gießt man heiß ab, führt sie in einen kurzhalsigen Rundkolben über und entfernt den Alkohol durch Destillation. Um den Rückstand von dem noch anhaftenden Wasser möglichst zu befreien, übergießt man denselben mit wenig absolutem Alkohol, destilliert den letzteren ab und wiederholt diese Operation noch einmal. Alsdann wird der Rückstand mit einer größeren Menge absoluten Alkohols übergossen, und der mit einem Rückflußkühler verbundene Kolben etwa eine Stunde im Sieden erhalten. Endlich ersetzt man den Kühler durch eine Chlorcalciumröhre und läßt den Kolben über Nacht erkalten. Die alkoholische Flüssigkeit wird abgegossen resp. abfiltriert und bis zur Trockne eingedampft. Nachdem die Reste des Alkohols durch zweimaliges Eindampfen mit kleineren Mengen Wasser verjagt sind, wird der Rückstand in Wasser gelöst, und die in der Lösung enthaltene Schwefelsäure durch vorsichtigen Zusatz von Barytwasser entfernt. Die mit Kohlensäure gesättigte und filtrierte Flüssigkeit wird nun unter stark vermindertem Druck bis zur Trockne eingedampft, und diese Operation noch zweimal mit kleineren Mengen absoluten Alkohols wiederholt. Den auf solche Weise entwässerten Rückstand übergießt man mit absolutem Alkohol und digeriert ihn mit demselben unter öfterem Umschütteln während einer Stunde bei etwa 50°. Nachher wird die alkoholische Flüssigkeit abgegossen resp. abfiltriert und in einer weithalsigen verschließbaren Flasche mit einer heißen konzentrierten absolutalkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid ausgefällt. Der über Nacht im Eisschrank aufbewahrte krystallinische Niederschlag wird scharf abgesaugt und mit absolutem Alkohol gewaschen. Der vom anhaftenden Alkohol befreite Niederschlag wird fein zerrieben, in einen langhalsigen Jenaer Rundkolben übergeführt und nach Zusatz von Tierkohle auf dem Luftbade unter gutem Umschütteln mehrmals mit Wasser ausgekocht. Man filtriert die Auszüge durch einen Heißwassertrichter und engt sie stark ein. Beim Stehen in der Kälte scheiden sich zuweilen spärliche Krystalldrusen des Carnitinquecksilberchlorids $C_7H_{15}NO_3 \cdot 2HgCl_2$ aus. Die von denselben

getrennte Flüssigkeit wird nun ein wenig mit Wasser verdünnt und mit Schwefelwasserstoff behandelt, das entstandene Quecksilbersulfid abgesaugt und gewaschen, das Filtrat mit Natriumcarbonat sofort neutralisiert und bis zur Trockne eingedampft. Nachdem das Natriumchlorid durch Behandlung des Rückstandes mit absolutem Alkohol möglichst entfernt ist, wird endlich die wässerige alkoholfreie Lösung zuerst mit 20%iger Goldchlorwasserstoffsäure und nachher mit einer stärkeren etwa 33%igen Lösung des Reagenses ausgefällt. Es entsteht dabei im Anfang gewöhnlich ein geringer dunkelgefärbter, schmutziger Niederschlag, welcher entfernt wird. Auf erneuten Zusatz von Goldchlorid erhält man nun weiter mehrere Fraktionen eines rein gelben krystallinischen Niederschlags; dieselben bestehen hauptsächlich aus den Goldverbindungen zweier bis jetzt unbekannter organischer Basen.

Es wurden von uns auf die soeben beschriebene Weise zwei Portionen Liebigs Fleischextrakt verarbeitet. Auf Hinzugabe von 20%iger Goldchlorwasserstoffsäure zu der Lösung, welche aus den Sublimatverbindungen der ersten 206 g wiegenden Portion des Extraktes erhalten worden war, schied sich allein der erwähnte schmutzige, dunkelgefärbte Niederschlag ab. Nach Entfernung desselben wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbade etwas eingeengt und mit 33%iger Lösung des Reagenses ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit kaltem Wasser vorsichtig ausgewaschen. Die nach einmaligem Umkrystallisieren erhaltenen gelben Nadeln wurden zerrieben und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die Substanz enthielt kein Krystallwasser und schmolz bei etwa 128—130°; zwei Bestimmungen des Goldes ergaben 41,75% und 41,91% Au.

I. 0,1540 g Substanz ergaben nach dem Glühen 0,0643 g = 41,75% Au.

II. 0,1484 g Substanz ergaben 0,0622 g = 41,91% Au.

Das zweite Mal umkrystallisiert wies die Substanz denselben Schmelzpunkt und denselben Goldgehalt auf.

III. 0,1017 g Substanz ergaben 0,0429 g = 42,18% Au.

IV. 0,1673 g Substanz ergaben 7,1 ccm Stickstoff bei 19° und 748 mm Bar. = 4,87% N.

Die Substanz wurde noch ein drittes Mal umkrystallisiert und der Analyse unterworfen. Schmelzpunkt bei 129° (nicht scharf).

V. 0,1591 g Substanz ergaben 0,0811 g CO_2 und 0,0426 g H_2O , entsprechend 13,89% C und 2,99% H.

VI. 0,1162 g Substanz ergaben 0,0567 g CO_2 und 0,0329 g H_2O , entsprechend 13,34% C und 3,16% H.

VII. 0,1672 g Substanz ergaben 0,0823 g CO_2 und 0,0445 g H_2O , entsprechend 13,42% C und 2,98% H.

VIII. 0,2223 g Substanz ergaben 9,3 ccm Stickstoff bei 20° und 752 mm Bar. = 4,83% N.

IX. 0,1551 g Substanz ergaben 0,0649 g = 41,84% Au.

X. 0,1408 g Substanz ergaben 0,1716 g AgCl , entsprechend 30,11% Cl.

XI. 0,1632 g Substanz ergaben 0,1956 g AgCl , entsprechend 29,64% Cl.

Aus den soeben angeführten analytischen Belegen lassen sich folgende Mittelwerte berechnen: C 13,55%, H 3,04%, N 4,85%, Au 41,92%, Cl 29,88%. Es bleiben folglich für den Sauerstoff 6,76% nach. Diese Prozentzahlen stimmen sehr gut für die Formel $\text{C}_{11}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4\text{Au}_2\text{Cl}_8$ (Mol.-Gew. 944,33).

Gefunden im Mittel: Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4\text{Au}_2\text{Cl}_8$:

C	13,55% ¹⁾	13,98%
H	3,04%	2,99%
N	4,85%	4,45%
Au	41,92%	41,76%
Cl	29,88%	30,04%
O	(6,76%)	6,78%.

Um zu sehen, ob die neuentdeckte Base einen konstanten Bestandteil des Liebigs Fleischextraktes darstellt, und um uns über die darin enthaltene Menge derselben ein Urteil zu schaffen, haben wir noch eine andere, größere, 453 g wiegende

¹⁾ Während der Korrektur wurde die Substanz noch das vierte Mal umkrystallisiert und darin der Kohlenstoff und Wasserstoff bestimmt: 0,3700 g Substanz ergaben 0,1893 g CO_2 und 0,0974 g H_2O , entsprechend 13,95% C und 2,94% H.

Portion des Extraktes auf die oben beschriebene Weise verarbeitet.

Nach Entfernung des schwarzbraunen, schmutzigen Niederschlages, welcher sich auf Hinzufügung von 20%igem Goldchlorid zu der aus den Sublimatverbindungen dieser Portion erhaltenen Flüssigkeit abgeschieden hatte, wurde mit dem Zusatz desselben Reagenses fortgeföhren. Der neue Niederschlag wurde abgesaugt und zweimal umkrystallisiert. Die Substanz schied sich dabei teilweise als dunkelgefärbtes Öl ab, welches beim Stehen allmählich zu einem harten Plättchen erstarrte; darüber sammelten sich nadelförmige Krystalle, hellgelbe und viel dunklere orangefarbene. Bekanntlich scheidet sich auf solche Weise das Golddoppelsalz des Carnitins aus heißen konzentrierten Lösungen ab;¹⁾ auch der Schmelzpunkt, welcher bei etwa 140° lag, deutete darauf hin, daß die Substanz höchstwahrscheinlich nicht ganz reines Carnitin war. Nach weiterem zweimaligem Umkrystallisieren war der Schmelzpunkt bis auf etwa 150° gestiegen (das Carnitingolddoppelsalz schmilzt eben bei 150—153°); die Goldbestimmung lieferte einen ebenfalls für die Goldverbindung des Carnitins passenden Wert (gef. 39,88% Au, berechnet für $C_7H_{16}NO_3 \cdot AuCl_4 = 39,35\%$ Au).

Die etwas eingeengte Mutterlauge vom Carnitingoldchlorid wurde nun weiter mit 33%iger Goldchlorwasserstoffsäure ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt und vorsichtig gewaschen. Nach einmaligem Umkrystallisieren wurde ein Teil der etwa 5 g wiegenden Substanz zerrieben, im Vakuumexsikkator getrocknet und analysiert. Die Substanz enthielt kein Krystallwasser und schmolz bei 129° (nicht scharf).

XII. 0,1816 g Substanz ergaben 0,0897 g CO₂ und 0,0485 g H₂O, entsprechend 13,47% C und 2,99% H.

XIII. 0,2297 g Substanz ergaben 9,2 ccm Stickstoff bei 20° und 751 mm Bar. = 4,59% N.

XIV. 0,2230 g Substanz ergaben 0,0933 g = 41,84% Au.

XV. 0,1588 g Substanz ergaben 0,1915 g AgCl, entsprechend 29,83% Cl.

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

Gefunden:		Berechnet für $C_{11}H_{28}N_3O_4Au_2Cl_8$:
C	13,47%	13,98%
H	2,99%	2,99%
N	4,59%	4,45%
Au	41,84%	41,76%
Cl	29,83%	30,04%
O	(7,28%)	6,78%

Auf Grund der analytischen Belege, sowie aus der Tatsache, daß wir aus zwei verschiedenen Portionen des Liebigs Fleischextraktes haben ein und dieselbe Verbindung isolieren können, halten wir uns für berechtigt, anzunehmen, daß es uns gelungen ist, einen neuen konstanten Bestandteil dieses Extraktes, das «Kreatosin», dessen Goldverbindung die Zusammensetzung $C_{11}H_{28}N_3O_4Au_2Cl_8$ hat, in die Hände zu bekommen. Über die Natur dieser Base können wir vorläufig nichts Näheres aussagen. Die Ermittlung ihrer chemischen Struktur wird von uns in Angriff genommen werden, ebenso die mögliche Isolierung derselben aus frischen Muskeln.

Am Schluß möchten wir noch bemerken, daß es uns gelungen ist, aus den Mutterlaugen der Goldverbindung des Kreatosins noch eine andere bis jetzt unbekannt Base als Goldsalz, welches einen höheren Goldgehalt (43,71% Au) aufweist, zu isolieren. Näheres über dieselbe hoffen wir später in einem anderen Aufsätze anzugeben.