

Über die Herkunft des Kreatins im tierischen Organismus.¹⁾

Von

Karl Thomas.

(Der Redaktion zugegangen am 26. November 1913.)

I. Das Verhalten der Arginase zur γ -Guanidylbuttersäure und ϵ -Guanidylcapronsäure.

Über die Muttersubstanz des Kreatins hat man bis heute nur Vermutungen. Kreatin und Arginin sind die einzigen Guanidylsäuren, die im Körper vorkommen. Es lag nahe, diese miteinander in Verbindung zu bringen. Jaffé²⁾ gab Kaninchen subcutan³⁾ Argininnitrat; die Kreatinmenge im Harn wurde nur sehr wenig größer, die in den Muskeln blieb gleich. Zu einem sicheren Ergebnis war also auf diesem Wege nicht zu gelangen. Einige Jahre später machte Knoop⁴⁾ dann wieder auf diese Beziehungen aufmerksam. Der Abbau des Arginins bis zur Guanidylelessigsäure würde ganz im Einklang stehen mit den Gesetzen über den Abbau von Amino- und Fettsäuren im tierischen Organismus; die Umwandlung der Guanidylelessigsäure in Kreatin durch Methylierung im Tierkörper haben bereits Jaffé,⁵⁾ Dorner⁶⁾ und Czernecki-Salkowski⁷⁾ beobachtet.

¹⁾ Dis Untersuchung wurde im Frühjahr 1911 im physiologisch-chemischen Institut in Tübingen begonnen, im Winter 1912/13 im physiologischen Institut in Greifswald und darnach im Kaiser-Wilhelm-Institut für Arbeitsphysiologie fortgesetzt.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 430, 1906.

³⁾ Bei oraler Darreichung von Arginin (oder argininreichem Eiweiß) ist die Ausscheidung des Gesamtkreatins nicht vermehrt (Jaffé, van Hoogenhuyze und Verploegh, Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 415, 1905).

⁴⁾ Desgl., Bd. 67, S. 495, 1910.

⁵⁾ l. c.

⁶⁾ Desgl., Bd. 52, S. 225, 1907.

⁷⁾ Desgl., Bd. 44, S. 294, 1905; s. hierzu die Bemerkung von Jaffé, diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 453.

Auffallend ist bei dieser Annahme allerdings, daß Guanidyl-essigsäure trotz ihrer Schwerlöslichkeit, trotzdem sie nur zu wenigen Prozent der Methylierung anheimfällt und zum größten Teil unverändert wieder ausgeschieden wird, bisher als normaler Bestandteil des Organismus noch nicht aufgefunden worden ist. Neubauer¹⁾ führte noch mehr Wahrscheinlichkeitsgründe dafür an, daß Arginin als Muttersubstanz des Kreatins zu gelten hat. Er weist auf das Fehlen der Arginase im Muskel hin und darauf, daß die anderen Annahmen experimentell nicht zu stützen sind. Er hätte noch auf die schwere Angreifbarkeit des Guanidinkomplexes im Tierkörper (Pommerrenig)²⁾ hinweisen können und darauf, daß das Fleisch aus argininreichen Eiweißkörpern besteht (Osborne),³⁾ und daß die Arginase nur Arginin, keine anderen Guanidinderivate, z. B. auch nicht Kreatin und Guanidyllessigsäure spaltet (Dakin).⁴⁾

Eine Guanidylsäure mit gerader Anzahl von C-Atomen müßte nach dieser Anschauung die gleiche Reaktionsfolge im intermediären Abbau geben, wie das Arginin. Ich begann daher meine Arbeit besonders im Hinblick auf die spezifische Wirkung der Arginase mit der Guanidylbuttersäure und Guanidylcapronsäure.

Vor kurzem erschien eine Arbeit von Inouye.⁵⁾ Er durchspülte überlebende Leber mit Arginin und fand stets eine Zunahme des Gesamtkreatins, allerdings in so geringem Grade, daß auch er einen endgültigen Beweis für die Bildung des Kreatins aus Arginin nicht beibringen konnte.

Eine ausführliche Kritik der bisherigen Arbeiten zu dieser Frage gab v. Fürth⁶⁾ und vor allem Riesser.⁷⁾

¹⁾ Über den Abbau der Aminofettsäuren in Abderhaldens Handlexikon der Biochemie, Bd. 4, S. 385, 1911.

²⁾ Hofmeisters Beitr. zur Physiol. und Path., Bd. 1, S. 561, 1902.

³⁾ Americ. Journ. of Physiol., Bd. 24, S. 437, 1909.

⁴⁾ Journ. of Biol. Chem., Bd. 3, S. 435, 1907.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 81, S. 71, 1902.

⁶⁾ v. Fürth, Probleme der physiol. u. pathol. Chemie, Bd. 2, Vorlesung 31.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 415, 1913 (bes. S. 431 ff.).

Darstellung der ϵ -Guanidyl-n-capronsäure.

ϵ -Amino-n-capronsäure wurde nach den Angaben von Ad. Baeyer¹⁾ und Wallach²⁾ unter Benutzung der Angaben von v. Braun³⁾ aus Cyklohexanon (Poulenc Paris) dargestellt. Die Umlagerung des Oxims in Lactam erfolgt mit der vorgeschriebenen²⁾ Schwefelsäure in guter Ausbeute, wenn höchstens 3 g Oxim auf einmal verarbeitet werden, 100 g Keton geben ungefähr 35 g ϵ -Leucin.⁴⁾ Cyanamid wurde aus Kalkstickstoff nach F. Baum⁵⁾ gewonnen und aus trockenem Äther umkrystallisiert. Äquimolekulare Mengen von Aminosäure und Cyanamid werden in möglichst wenig Wasser gelöst und mit einigen Tropfen Ammoniak deutlich alkalisch gemacht. Sie bleiben einige Wochen unter zeitweisem Zusatz von neuem Cyanamid bei Zimmertemperatur stehen. Bereits nach wenigen Tagen beginnt sich die schwer lösliche Guanidylcapronsäure abzuscheiden. Die Krystalle werden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und abgepreßt. Beigemengtes Dicyandiamid wird durch Auskochen mit 96% igem Alkohol entfernt (Kontrolle durch das in Alkohol schwer lösliche, in langen feinen Nadeln krystallisierende Silbernitratdoppelsalz). Die Ausbeute an Guanidylcapronsäure beträgt bis zu 90% der Theorie. Das Produkt ist noch leicht gelblich (nach Kjeldahl 23,78% N, ber. 24,28%). Wird die wässerige Lösung des Chlorhydrats mit Ammoniak oder fixem Alkali versetzt, so fällt auch bei Überschuß an Alkali die freie ϵ -Guanidylcapronsäure aus. Mikrokrystalline Nadeln zu Drusen vereinigt. Kein Schmelzpunkt. In Wasser, auch in der Wärme sehr wenig löslich, bei Zimmertemperatur ungefähr 1 : 1400. Die durch Fällung mit Natronlauge aus dem Chlorhydrat erhaltene Säure schließt hartnäckig Kochsalz ein.

¹⁾ Liebigs Ann. der Chem., Bd. 278, S. 102.

²⁾ Desgl., Bd. 312, S. 187, 1900.

³⁾ Chem. Ber., Bd. 40, S. 1839.

⁴⁾ z. B. wurden bei einer Darstellung entsprechend 100 g Keton erhalten 78,1 g Oxim = 62 g Lactam = 28,3 g reines ϵ -Leucin. Die Mutterlaugen können ohne weitere Reinigung auf Guanidylcapronsäure verarbeitet werden.

⁵⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 26, S. 330, 1910.

Deshalb wurde die Säure durch Umkrystallisieren aus warmer Salzsäure in das Chlorhydrat übergeführt.

28 g ϵ -Guanidyl-n-capronsäure wurden in 150 ccm konzentrierter Salzsäure warm gelöst, nach dem Abkühlen fielen feine, rein weiße Nadeln aus; über Kaliumhydroxyd im Vakuum getrocknet betrug die Ausbeute 23,2 g oder 68,4% der Theorie. Durch Einengen der Mutterlauge bei mäßiger Wärme werden weitere, noch ziemlich reine Fraktionen des Chlorhydrats erhalten.

0,1501 g = 0,2212 g CO_2 = 40,19% C (ber. 40,07% C).

= 0,1030 \cdot H_2O = 7,68% H (> 7,69% H).

0,1954 g nach Kjeldahl = 20,03% N (ber. 20,06% N).

0,3304 \cdot in schwefelsaurer Lösung mit Silbersulfat gefällt, geben 0,2266 g AgCl = 16,97% Cl (ber. 16,91% Cl).

0,3242 g geben 0,2218 g AgCl = 16,93% Cl (ber. 16,91% Cl).

Schmelzpunkt 165° , scheinbar ohne Zersetzung, denn die Schmelze erstarrt zu einer Krystallmasse vom gleichen Schmelzpunkt, auch mit konzentrierter Salzsäure bleibt die Substanz unverändert. Das Chlorhydrat ist in Wasser sehr leicht löslich, leicht löslich in heißem Alkohol, weniger in kaltem. Bei Zimmer-temperatur lösen 100 g 99,6% Alkohol 2,188 g. Aus der nicht zu verdünnten wässrigen Lösung des Chlorhydrats fällt auf Zusatz von 33% iger wässriger Goldchloridlösung das Goldsalz in schiefen Oktaedern, frei von Krystallwasser, Schmelzpunkt 166° , wenig löslich in kaltem Wasser, leicht löslich in heißem Wasser, sehr leicht löslich in Alkohol.

0,0932 g geben 0,0359 g Glührückstand = 38,52% Au.

Berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}_3\text{HAuCl}_4$ = 38,43% Au.

Beim Zusatz von Platinchlorid zum Chlorhydrat wird keine Fällung erhalten.

Durch doppelte Umsetzung mit Silbernitrat wird das Nitrat erhalten, derbe Prismen, ziemlich wenig löslich in kaltem Wasser, Schmelzpunkt 154 — 155° , über 170° Zersetzung.

0,1551 g Substanz = 31,9 ccm N, 21° , 763 mm, 33% Kalilauge; gef. 23,63% N.

Berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_6\text{N}_4$ = 23,78% N.

Guanidylcapronsäureacetat, durch Umkrystallisieren der freien Säure aus heißem Eisessig erhalten, dünne 6 eckige Tafeln, wird bei Berührung mit Wasser, bei schwachem Erwärmen an der Luft oder im Vakuum, gespalten, daher kein Schmelzpunkt.

Die saure wässrige Lösung wird nicht gefällt durch Silbernitrat, dagegen durch Phosphorwolframsäure und vollständig durch Quecksilberacetat und Soda in alkoholisch wässriger Lösung.

ε-Guanidylcapronsäure und Leberpreßsaft.

Das dem durch Entbluten getöteten Tier sofort entnommene Organ wurde durch die Fleischhackmaschine gegeben, mit Kieselerde verrieben und auf der Buchner-Pressen ausgepreßt. Nach Toluolzusatz wird der Saft bei 37° gehalten.

Die jetzt folgende Aufarbeitung geschah in allen Versuchen sinngemäß in gleicher Weise:

Nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure bis zu eben kongosaurer Reaktion wird erwärmt, das halbe Volumen 96%igen Alkohols zugesetzt, filtriert und sorgfältig mit heißem Wasser ausgewaschen. Darauf wird Filtrat und Waschflüssigkeit im Vakuum bei 40° Badtemperatur eingeengt, reines Baryumcarbonat im Überschuß zugegeben und im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird 3mal mit 99,6%igem Alkohol ausgekocht (= Alkoholextrakt I). Die Lösung des Rückstands in wässriger Salzsäure wird wieder im Vakuum zur Trockne eingedampft, und wieder mit 99,6%igem Alkohol erschöpft (= Alkoholextrakt II). Der Rückstand enthält jetzt nur noch wenige Milligramm N. Die Alkoholextrakte werden im Vakuum eingeengt, die Rückstände mit wenig Wasser aufgenommen, wenn nötig mit Tierkohle entfärbt und bei Zimmertemperatur im Vakuum über Schwefelsäure bzw. Kaliumhydroxyd eingeengt. In den Alkoholextrakt I mußte Harnstoff übergegangen sein. Er wurde mit nitritfreier konzentrierter Salpetersäure gefällt. Das Nitrat — nach Salkowski¹⁾ auf Beimengungen von Hypoxanthin- und Kaliumnitrat geprüft — wird in Wasser gelöst und mit überschüssigem Baryumcarbonat zur Trockne verdampft, mit Alkohol ausgezogen, der Alkohol verjagt, nochmals mit absolutem Alkohol aufgenommen und mit der entsprechenden Menge alkoholischer Oxalsäure gefällt. Der oxalsaure Harnstoff wurde durch Zersetzungspunkt

¹⁾ Hoppe-Seyler-Thierfelder, 8. Aufl., 1909, S. 653.

und Bestimmung seines N-Gehaltes nach 1—2 maligem Umkrystallisieren aus Alkohol und Wasser identifiziert. Der Rückstand des Alkoholextraktes II wird, wenn nötig, mit Tierkohle entfärbt und der freiwilligen Krystallisation überlassen. Tritt diese nach einigen Tagen ein, so wird das Chlorhydrat der zugesetzten Guanidylsäure auf Ton abgepreßt. Die Mutterlauge, beim Umkrystallisieren der abgepreßten Krystalle gewonnen, wurde mit dem Rückstand, der aus dem Tonteller herausgelöst wird, vereinigt und noch einmal wie eben angegeben behandelt. Tritt keine freiwillige Krystallisation mehr ein, so wird die eingeengte Lösung mit einigen Tropfen Salzsäure und 33%iger wässriger Goldchloridlösung versetzt. Von allenfalls ausgeschiedenem schwer löslichem Aurat der Guanidylsäure wird abfiltriert; das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt und eingedunstet, aus ihm wird entweder direkt durch alkoholisches Platinchlorid die entsprechende Aminosäure zu gewinnen versucht oder besser aus der Phosphorwolframsäurefällung dieser Fraktion.

Versuch I. Hund. Aus 235 g bluthaltiger Leber werden 50 ccm Preßsaft gewonnen. 25 ccm davon mit 30 ccm destilliertem Wasser und 2,00 g ϵ -Guanidylcapronsäure 20 Stunden bei 37° nach Zusatz von Toluol. Reaktion wird dabei lackmusauer. Es wurde erhalten:

a) Kein Harnstoffnitrat,¹⁾ b) 0,78 g ϵ -Guanidylcapronsäurechlorhydrat (Schmelzp. 165°), aus dessen Mutterlauge 1,34 g Chloraurat, nach dem Umkrystallisieren 1,19 g vom Schmelzpunkt 153—157° (statt 166°), zwei weitere unreine Fraktionen vom Chloraurat 0,26 g,²⁾ c) keine Aminosäure.

Es werden also 57% der zugesetzten Guanidylsäure unverändert zurückgewonnen und keine Spaltungsprodukte aufgefunden.

Versuch 2. Hund. Leberpreßsaft mit 3,00 g ϵ -Guanidylcapronsäure und Toluol unter zeitweiligem Schütteln und Ab-

¹⁾ An dieser Stelle wurden 0,107 g eines kaliumnitratreichen Gemisches erhalten, das kein Hypoxanthin enthielt und bei 220° noch unverändert war.

²⁾ Wurde schon bei 130° weich und war bei 150° geschmolzen.

stumpfen der sauren Reaktion durch Soda. 20 Stunden bei 37°. Es wurde erhalten:

a) Kein Harnstoff. b) 1,40 g ϵ -Guanidylcapronsäurechlorid sowie 0,3 g einer stark mit anorganischen Chloriden verunreinigten zweiten Fraktion. Letztere wurde als Chloraurat, erstere durch Schmelzpunkt (165—166°) und Mischprobe, Chloraurat und Analyse nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol und Trocknen über P_2O_5 bei 80° im Vakuum identifiziert.

0,3071 g gaben mit Silbersulfat in schwefelsaurer Lösung 0,2073 g AgCl, das Filtrat verbraucht nach Kjeldahl 43,40 ccm $n/10$ -Säure.

Gef. = 16,70% Cl	Ber. = 16,91% Cl.
19,78% N	20,05% N.

Es wurden also gegen 40% der zugesetzten Guanidylsäure wieder gewonnen und keine Spaltprodukte aufgefunden.

Leberpreßsaft, d. h. in diesem Falle Arginase, spaltet ϵ -Guanidylcapronsäure nicht.

γ -Guanidylbuttersäure und Leberpreßsaft.

Die Darstellung der γ -Guanidylbuttersäure erfolgte nach Kutscher¹⁾ durch Anlagerung von Cyanamid an die Aminosäure. Zum Nachweis benutzte ich ebenso wie Kutscher das Chlorhydrat und Chloraurat; hierfür ist aber auch die freie Säure geeignet, denn sie fällt aus heißem Wasser beim Abkühlen mit 2 Mol. Krystallwasser; schon im nicht evakuierten Exsikkator verwittern die Krystalle rasch. Auch Kutscher hatte offenbar ein wasserhaltiges Präparat zuerst in Händen gehabt;²⁾ die übrigen Guanidylsäuren von C_2 — C_6 sind nur wasserfrei bekannt.

0,753 g lufttrockene Substanz verloren beim Trocknen 0,1526 g an Gewicht, daraus berechnet sich ein Wassergehalt von 20,26%, während Guanidylbuttersäure + 2 H_2O 19,90% erfordern. Die wasserfreie Substanz enthielt nach Kjeldahl 28,65% N statt der berechneten 28,97%. Auch bei anderen Präparaten von γ -Guanidylbuttersäure wurde der gleiche Krystallwassergehalt gefunden.

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 43, 3, S. 2882, 1910.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 415, 1901.

1,3540 g lufttrockene Substanz verlieren bei Zimmertemperatur im Vakuum über Schwefelsäure 0,2692 g oder 19,88% H_2O .

0,1302 g unter den gleichen Bedingungen 0,0254 g oder 19,51%
0,9813 g bei 100° 0,1903 g oder 19,39%.

Versuch I. Der Versuch wurde mit dem gleichen Preßsaft der Hundeleber und in genau gleicher Weise unter Zusatz von 2,00 g γ -Guanidylbuttersäure wie bei Versuch I unter Guanidylcapronsäure angesetzt. Erhalten wurden:

a) 0,978 g Harnstoffnitrat (Rohprodukt); daraus 0,30 g Harnstoff, identifiziert als Oxalat.

0,1017 g verbrauchen nach Kjeldahl 19,05 ccm n_{10} -Säure = 26,22% N
Ber. für $(CON_2H_4)_2C_2O_4H_2 = 26,67\%$ N.

b) 0,34 g Aminobuttersäure (Rohprodukt). Sie wurde in Methylalkohol gelöst, von Anorganischem abfiltriert und mit Äther bis zur Trübung versetzt. Nach einigem Stehen im Eisschrank fielen 0,157 g weiße Nadeln aus, die sich bei 189° zersetzen. (Schmelzpunkt der reinen γ -Aminobuttersäure 202°.) Zur Identifizierung wurden sie in das Platinat übergeführt. Ausbeute 0,24 g, Schmelzpunkt 211°, keine Depression bei der Mischprobe mit dem Platinat der synthetischen γ -Aminobuttersäure, das sich nach Abderhalden¹⁾ aber bei 220° zersetzt. Deshalb wurde nochmals aus wässrigem Äthylalkohol umkrystallisiert und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet, Ausbeute 0,09 g, der Schmelzpunkt änderte sich aber nicht; die Analyse nach Wallach²⁾ ergab zu niedrige Werte:

0,0805 g geben 0,1067 g AgCl und 0,0241 g Pt

Gef. = 29,94% Pt (ber. 31,65%)

„ = 32,79% Cl („ 34,47%)

Pt : Cl gef. 1 : 6,019.

Von der zugesetzten Guanidylsäure wurde also nichts wiedergefunden; von den Spaltprodukten wurden vom Harnstoff 38% der Theorie, von der Aminosäure nur 11% isoliert.

Versuch 2. Kaninchen, Preßsaft von Leber und Niere; ca. 20 Stunden bei 37° unter Zusatz von 1,0 g γ -Guanidylbuttersäure und Toluol; Reaktion zum Schluß lackmussauer, Eiweiß zum Teil ausgefallen. Aufarbeitung wie oben; erhalten wurde:

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 81, S. 299, 1912.

²⁾ H. Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung. 2. Aufl., 1909, S. 291.

a) Kein Harnstoff. b) 0,84 g γ -Guanidylbuttersäurechlorhydrat (= 67% der Theorie). Aus der Mutterlauge konnte noch eine Spur γ -Guanidylbuttersäurechloraurat, aber c) keine Aminosäure erhalten werden.

Die Guanidylsäure war also nicht gespalten worden; da die Arginase auch in der Leber vom Kaninchen vorkommt, muß sie durch die offenbar rasch aufgetretene saure Reaktion des Preßsaftes unwirksam geworden sein.

Versuch 3. Wurde in gleicher Weise und mit den gleichen Mengen desselben Preßsaftes, wie unter Versuch 2 bei der ϵ -Guanidylcapronsäure angegeben, unter Zugabe von 3,00 g γ -Guanidylbuttersäure angestellt. Erhalten wurde:

a) 2,09 g Harnstoffnitrat (Rohprodukt); daraus 1,56 g oxalsaurer Harnstoff. Zersetzungspunkt 180° , N-Gehalt nach Kjeldahl 25,90%, nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol 26,19% (berechnet 26,67% N). b) Keine Guanidylsäure; an ihrer Statt wurden 0,04 g eines Chloraurates erhalten, das sich ohne vorheriges Schmelzen zwischen 170 und 210° zersetzte. c) Keine Aminosäure; in der letzten Lösung, in der sie enthalten sein sollte, waren nur noch 33 mg N.

Die Guanidylsäure war also gespalten worden. Von den Spaltungsprodukten konnte aber nur der Harnstoff (als Oxalat zu 71,8% der berechneten Menge) isoliert werden.

Es ist also der Schluß erlaubt: Die Guanidylbuttersäure wird durch Leberpreßsaft in Harnstoff und γ -Aminobuttersäure gespalten. Die Aminobuttersäure wird offenbar weiter abgebaut.

Sowie neue Mengen der Guanidylbuttersäure dargestellt sind, soll der Versuch mit einem gereinigten Arginasepräparat wiederholt werden. In einem Vorversuch mit einer kleinen Menge Guanidylbuttersäure und wirksamer Arginase (durch Alkohol-Ätherfällung aus Leberpreßsaft erhalten) wurde unveränderte Säure zurückerhalten.

γ -Guanidylbuttersäure und Muskelpreßsaft.

Wenn die γ -Guanidylbuttersäure durch die im Leberpreßsaft vorhandene Arginase gespalten worden ist, so darf

Muskelpreßsaft, der dies Ferment wahrscheinlich nicht enthält,¹⁾ sie nicht spalten.

Versuch 1. Kaninchen frisch entblutet. Preßsaft aus der quergestreiften Muskulatur mit 1,0 g Guanidylbuttersäure und Toluol 20 Stunden bei 37°. Reaktion zum Schluß lackmus-sauer, Eiweiß zum Teil ausgefallen.

Die Aufarbeitung geschah in gleicher Weise wie bei dem Leberpreßsaft, nur mußte auf die Gegenwart von Kreatin (bezw. Kreatinin) Rücksicht genommen werden. Aus dem bei niederer Temperatur eingengten Alkoholextrakt I krystallisierte das Kreatin im Laufe einiger Tage und wurde durch Abpressen auf Ton entfernt. Schied sich aus dem mit Wasser aufgenommenen Rückstand weiteres Kreatin ab, so wurde es auf gleiche Weise abgetrennt und hierauf der Rest mit konzentrierter Salpetersäure auf Harnstoff geprüft. Isoliert werden konnte:

a) Kein Harnstoff. b) Keine Guanidylsäure. c) Keine Aminosäure.

Versuch 2. Hund, in Äthernarkose entblutet. Der Preßsaft aus 750 g Fleisch der Hinterbeine wurde in 3 gleiche Teile geteilt.

Nr. I erhielt keinen Zusatz, Nr. II erhielt 3,0 g Guanidylbuttersäure, Nr. III 3,0 g Arginincarbonat, alle 3 Teile außerdem Toluol und Soda nach Bedarf zur Neutralisation entstandener Säure; sie blieben 20 Stunden bei 37° stehen. Erhalten wurde: a) kein Harnstoff, b) Guanidylbuttersäure, c) keine Aminosäure.

In dem neutralen Alkoholauszug²⁾ waren von der zugesetzten Säure 1,2 g enthalten, obwohl sie in reinem Zustande in Alkohol unlöslich ist; daß Guanidylbuttersäure vorlag, wurde nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser durch die Bestimmung des Krystallwassergehalts und des Stickstoffs bewiesen, ferner dadurch, daß das Chlorhydrat der Substanz den richtigen Schmelzpunkt (188°) und Chlorgehalt (19,63% statt 19,53%) zeigte.

¹⁾ Kossel und Dakin, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 183, 1905.

²⁾ Hier konnte die offenbar von Anfang an im Preßsaft vorhanden gewesene kleine Menge Kreatin dieses Mal nicht nachgewiesen werden; offenbar war sie mit der reichlichen Menge Guanidylbuttersäure ausgefallen und durch diese verdeckt worden.

Aus Alkoholauszug II krystallisierte kein Chlorid, erst nachdem er mit PWS gereinigt war, fielen mit Goldchlorid aus der PWS-Fällung 0,2 g Öl, die in der Kälte bald fest wurden. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser schmelzen sie bei 185—187° nach vorherigem Sintern bei 178°, nach nochmaligem Umkrystallisieren aus wässriger Salzsäure und Trocknen über Kaliumhydroxyd im Vakuum bei 193—195°. Die Krystalle hatten das Aussehen vom Chloraurat der γ -Guanidylbuttersäure, der Goldgehalt war aber 2% zu hoch.

0,1715 g = 0,0692 g Glührückstand = 40,35% Au (ber. 38,43% Au).

Also Muskelpreßsaft hat die γ -Guanidylbuttersäure nicht gespalten, obwohl der verwendete Preßsaft offenbar nicht frei von Arginin war.

In einem Kontrollversuch mit dem gleichen Preßsaft konnte nämlich zugesetztes Arginin nicht wieder zurückgewonnen werden, dagegen wurden 0,719 g Harnstoffnitrat (Rohprodukt)¹⁾ gewonnen; er wurde identifiziert als oxalsaurer Harnstoff; nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol enthält er 23,46% N, nach nochmaligem Umkrystallisieren aus Wasser 25,96% N (ber. 26,67%).

Da die Arginase in vielen Organen (z. B. auch in den Lymphdrüsen) nach Kossel und Dakin vorkommt, so wurde der Versuch mit Preßsaft von Muskeln wiederholt, die durch sorgfältiges Präparieren und Zerschneiden so vollständig wie möglich von anhängendem fremden Gewebe befreit waren.

Versuch 3. Hund, in Äthernarkose entblutet. Aus 960 g gereinigten Muskeln werden 450 ccm Preßsaft erhalten; 40 ccm davon bleiben mit 3,91 g γ -Guanidylbuttersäure + 260 ccm destilliertem Wasser + 10 ccm Toluol 18 Stunden bei 37° stehen, die im Anfang entstandene Säure wird durch Soda gebunden, die Flüssigkeit reagiert zum Schluß eben alkalisch gegen Lackmus. Die Aufarbeitung geschah wie früher, nur wurde bei den Vakuumdestillationen, die zur Bereitung der Alkoholauszüge nötig sind, das überaus starke Schäumen durch

¹⁾ In der gleichen Menge des gleichen Preßsaftes ohne Zusatz von Arginin 0,013 g Substanz. Beim Aufarbeiten mit Harnstoff wurde ein schmieriger Rückstand erhalten, der keine Biuretreaktion gab.

Zugabe einiger Tropfen von rohem Maschinenöl verhindert. Der erste schwefelsaure wässrige Auszug enthielt 1,286 g N (der Preßsaft allein 0,201 g nicht koagulierbaren N); in den ersten Alkoholauszug gingen davon 0,104 g. Harnstoff wurde nicht gefunden. Der beim Auskochen mit Alkohol verbliebene Rückstand wurde mit wässriger Salzsäure aufgenommen und im Vakuum wieder zur Trockene verdampft. Er wurde darauf 3 mal mit Alkohol ausgezogen, aber offenbar nicht erschöpft, denn der dabei gebliebene Rückstand enthielt noch 0,321 g N. Die alkoholischen Auszüge ergaben nach dem Einengen 2,32 g γ -Guanidylbuttersäurechlorhydrat, die in die freie Säure übergeführt und durch N-Bestimmung identifiziert wurden. Die Mutterlauge davon enthielt noch 169 mg N; sie gab mit Goldchlorid keine krystallinische Fällung, sie wurde durch Fällern mit Mercuriacetat und Soda in wässrig alkoholischer Lösung gereinigt (wobei ein Verlust von 4 mg N entstand) und nach Entfernung des Quecksilbers eingeengt. Auf Ton abgepreßt wurden 0,09 g braungefärbte Krystalle erhalten, die in wenig wässriger Salzsäure gelöst mit konzentrierter Goldchloridlösung ein Goldsalz geben, das bei 198—199° schmolz und die Mischprobe mit γ -Guanidylbuttersäurechloraurat bestand.

Angenommen, der im Rückstand für die Aufarbeitung verloren gegangene Rest von 321 mg N ist dort als Guanidylbuttersäure (= 1,1 g) vorhanden gewesen, so sind von der zugesetzten Säure 3,0 g oder 80% wiedergefunden worden. Eine Spaltung war nicht nachzuweisen.

Es ist also der Schluß erlaubt: γ -Guanidylbuttersäure wird durch den Preßsaft reiner Muskeln nicht gespalten. Damit gewinnt die Annahme, daß der Muskel Arginin abbaut, ohne die Guanidingruppe zu spalten, an Wahrscheinlichkeit, besonders wenn man bedenkt, daß Arginase nur die ω -Guanidylsäure spalten kann, die als nächstes Zwischenprodukt bei einem derartigen Argininabbau entstehen könnte.

Über das Verhalten der beiden Guanidyl- und Aminosäuren im Stoffwechsel und das des Arginins und der γ -Guanidylbuttersäure speziell im Muskelstoffwechsel wird demnächst berichtet werden.

Ergebnis.

1. Es werden die Darstellung und die Eigenschaften der ϵ -Guanidylcapronsäure mit ihrem Chlorid, Chloraurat und Nitrat beschrieben.

2. Leberpreßsaft spaltet die ϵ -Guanidylcapronsäure nicht.

3. Leberpreßsaft spaltet die γ -Guanidylbuttersäure in Harnstoff und γ -Aminobuttersäure.

4. Muskelpreßsaft spaltet die γ -Guanidylbuttersäure nicht und enthält wahrscheinlich keine Arginase.
