

# Darstellung von Phenylglykocyamidinen, ihr Verhalten gegen Alkalien nebst Versuchen über die Veränderungen des Kreatins durch verdünntes Alkali.

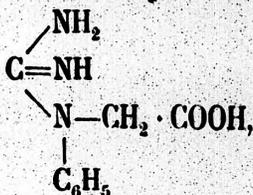
Von

Alexander Ellinger und Zenji Matsuoka (aus Osaka, Japan).

(Aus dem Universitäts-Laboratorium für medizinische Chemie und experimentelle Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. Februar 1914.)

Zur Aufklärung einiger Punkte des Kreatinstoffwechsels, namentlich der noch immer verschieden beantworteten Frage, ob bzw. in welchem Maße Kreatin im Tierkörper in Kreatinin übergeht, schien es nicht unzweckmäßig, Fütterungsversuche mit einer körperfremden substituierten Guanidoessigsäure zu machen, deren dem Kreatinin entsprechendes Lactam sich neben dem Kreatinin des Harns hätte leicht nachweisen lassen. Von diesem Gedankengang ausgehend, versuchten wir das bisher unbekannte Phenylglykocyamin



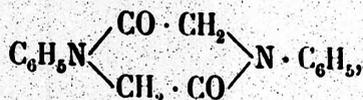
darzustellen.

Versuche zur Darstellung dieses Körpers aus Cyanamid und Phenylglycin nach der Streckerschen Methode der Synthese von Glykocyaminen sind bereits im Jahre 1880 von Berger<sup>1)</sup> in A. W. Hofmanns Laboratorium angestellt worden. Sie führten aber nicht zu faßbaren Produkten, und über die in der Abhandlung in Aussicht gestellte Fortführung der Untersuchung ist nichts Weiteres bekannt geworden.

Auch unsere Bemühungen haben das gewünschte Ziel nicht erreicht. Sie klärten aber den Reaktionsverlauf insoweit auf,

<sup>1)</sup> F. Berger, Ber. d. chem. Ges., Bd. 13, S. 992 (1880).

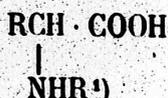
als zwar nicht das Phenylglykocyamin, aber dessen Lactam, das Phenylglykocyamidin, das mit dem Kreatinin große Ähnlichkeit zeigt, und als Nebenprodukt das Anhydrid des Phenylglycins, das Diphenyl- $\alpha,\gamma$ -diacipiperazin



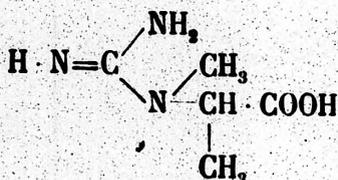
isoliert werden konnten.

Alle Versuche, das erhaltene Lactam nachträglich in die Guanidosäure zu verwandeln, waren vergeblich. Sie scheiterten daran, daß bei noch so gelinden hydrolytischen Spaltungen Ammoniak abgespalten wurde und Bildung eines Phenylhydantoin eintrat.

Die leichte Lactambildung bei dem Versuch, Guanidofettsäuren nach der Streckerschen Methode darzustellen, ist nicht ohne Analoga in der Literatur. Bei der Einwirkung von Cyanamid auf  $\alpha$ -Alkyl- $\alpha$ -Aminofettsäuren von der Zusammensetzung



scheint sie, wie Gansser nach seinen und Duvilliers Erfahrungen betont, die Regel zu sein. So erhielt Duvillier die Lactame (Glykocyamidine) direkt, wenn Cyanamide einwirken ließ auf  $\alpha$ -Methylamino-n-buttersäure,  $\alpha$ -Äthylamino-n-buttersäure,  $\alpha$ -Methylaminoisovaleriansäure und  $\alpha$ -Methylamino-n-capronsäure. Nur für die Reaktion zwischen Cyanamid und der  $\alpha$ -Methylaminopropionsäure lauten die Angaben verschieden. Hier erhielt Gansser ebenfalls sofort das Lactam, während Lindenberg zur Guanidosäure selbst, dem sogenannten Homokreatin, gelangte.



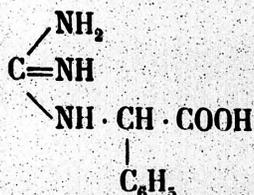
Dagegen erfolgt nach den bisherigen Erfahrungen die Bildung der offenen Guanidosäuren leicht, wenn nur ein Alkyl-

<sup>1)</sup> E. Gansser, Diese Zeitschrift, Bd. 61, S. 16, 1909, dort Literaturangaben.

rest in der Aminoessigsäure vorhanden ist, auf die Cyanamid einwirkt, sei es, daß dieses Alkyl an den Stickstoff der Aminogruppe gebunden ist (Kreatinsynthese aus Sarkosin) oder in die  $\text{CH}_2$ -Gruppe eingetreten ist (Alakreatin Baumanns,  $\alpha$ -Guanidobuttersäure,  $\alpha$ -Guanidoisovaleriansäure und  $\alpha$ -Guanidoisocaproensäure von Duvillier).

Es scheint also der Eintritt einer Phenylgruppe am Stickstoff des Glykokolls die Reaktion in ähnlicher Weise zu beeinflussen, wie der je eines Alkyls am Stickstoff und am Kohlenstoff der  $\text{CH}_2$ -Gruppe.

Befindet sich der Phenylrest in der  $\text{CH}_2$ -Gruppe, so ist nach den Erfahrungen von Henrik Ramsay<sup>1)</sup> eine offene Guanidosäure zu erhalten. Er beschreibt als Produkte der Einwirkung von Guanidin auf Phenylbromessigsäure ein amorphes Produkt, dessen Analysenzahlen auf die Formel einer Phenylguanidoessigsäure



stimmten. Bei der Wiederholung von Ramsays Versuch haben wir ausschließlich das Lactam dieser Säure — und zwar in krystallisiertem Zustand — erhalten und die gleiche Substanz entstand, wenn Guanidincarbonat mit Phenylaminoessigsäure  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH} \cdot (\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$  zusammengeschmolzen wurde.

### Experimenteller Teil.

#### 1. Einwirkung von Cyanamid auf Phenylglycin.

3 g Phenylglycin wurden mit 1 g Cyanamid<sup>2)</sup> in 6 ccm 95%igem Alkohol auf dem Wasserbad am Rückflußkühler 5 Stunden lang erhitzt. Es erfolgte alsbald klare Lösung. Nach 4 Stunden begann eine Ausscheidung nadelförmiger Krystalle.

<sup>1)</sup> Ramsay, Ber. d. chem. Ges., Bd. 41, S. 4392, 1908.

<sup>2)</sup> Für die freundliche Überlassung des für die Versuche nötigen Cyanamids sei der deutschen Gold- und Silberscheideanstalt (vorm. Rössler) in Frankfurt a. M. an dieser Stelle der beste Dank ausgesprochen.

In der erkalteten Lösung waren nach 20 Stunden daneben tafelförmige Krystalle wahrnehmbar. Das von der alkoholischen Mutterlauge abgesaugte Krystallgemisch wurde mit Wasser ausgekocht und der im Wasser unlösliche Teil in siedendem Alkohol gelöst.

Aus der alkoholischen Lösung schieden sich feine Nadelbüschel aus, die nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Alkohol bei  $263^{\circ}$  schmolzen. Die Krystalle lösen sich leicht in Eisessig und sind daraus durch Verdünnung mit Wasser wieder fällbar. Die Ausbeute betrug 0,16 g.

Die bei  $105^{\circ}$  getrocknete Substanz gab folgende Analysenzahlen:

0,1627 g Substanz : 0,4302 g  $\text{CO}_2$  und 0,0821 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

0,152 " " : 13,6 ccm N bei 767 mm Druck und  $14^{\circ}$ .

Berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ : C 72,15%, H 5,30%, N 10,53%.

(Mol.-Gew. 266,13) Gef.: C 72,11%, H 5,64%, N 10,57%.

Analysenzahlen und Schmelzpunkt stimmen für das als Diphenyl- $\alpha, \gamma$ -diacipiperazin bezeichnete Anhydrid des Phenylglycins. Die Identität wurde weiterhin durch die Entstehung von Indigo bei der Kalischmelze der Substanz bestätigt.

Aus der von dem Anhydrid abfiltrierten wässerigen Lösung schieden sich nach starkem Einengen auf dem Wasserbad etwa 0,2 g farbloser krystallinischer Blättchen aus, die nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol bei  $220^{\circ}$  sich färbten, und langsam erhitzt bei  $227-228^{\circ}$ , rasch erhitzt bei  $235$  bis  $236^{\circ}$  unter Zersetzung schmolzen.

Analyse der bei  $105^{\circ}$  getrockneten Substanz:

0,1543 g Substanz : 0,3468 g  $\text{CO}_2$  und 0,0738 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

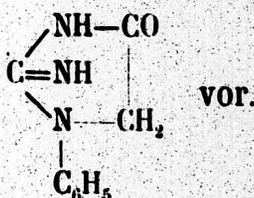
0,1661 " " verbrauchten, nach Kjeldahl bestimmt,

28,45 ccm  $n/10$ -Schwefelsäure.

$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ . Ber.: C 61,68%, H 5,19%, N 24,00.

(Mol.-Gew.: 175,1). Gef.: C 61,58%, H 5,38%, N 23,98.

Die Substanz bildet mit Mineralsäuren krystallinische Salze, ein schwer lösliches Pikrat (s. u.), ein gut krystallisierendes Chlorzink-Doppelsalz. Sie gibt in ähnlicher Weise wie das Kreatinin die Weylsche Reaktion mit Nitroprussidnatrium und die Jaffesche Reaktion mit Alkali und Pikrinsäure. Es lag also das Phenylglykocyamidin von der Formel



Weitere Mengen des in so geringer Menge entstehenden Phenylglykocyamidins kann man aus der ursprünglichen alkoholischen Mutterlauge auf folgende Weise erhalten:

Der Alkohol wird auf dem Wasserbade verjagt, der Rückstand mehrmals mit heißem Wasser ausgezogen und zuletzt mit Wasser ausgekocht, wobei die Hauptmenge als Harz zurückbleibt. Die wässerigen Auszüge werden auf dem Wasserbade stark eingengt und, da die nach tagelangem Stehen sich ausscheidenden Krystalle meist mit harziger Substanz verunreinigt sind, wird etwas absoluter Alkohol zugesetzt, so daß das Harz sich eben löst, während die Phenylglykocyamidinkrystalle ungelöst bleiben und abgesaugt werden.

Scheidet sich aus den wässerigen Auszügen überhaupt nichts Krystallinisches aus, so gelingt die Isolierung der Base noch durch fraktionierte Pikrinsäurefällung. Der sirupöse Rückstand wird dann mit viel Wasser aufgenommen, von etwas harziger Beimengung abfiltriert und mit wässriger Pikrinsäure versetzt, so lange ein flockiger Niederschlag entsteht. Von diesem wird abfiltriert, und auf weiteren Zusatz von Pikrinsäure fällt ein gut in rosettenförmig angeordneten Blättchen krystallisierendes Pikrat, das nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 203° schmilzt:

0,1289 g Substanz, bei 105° getrocknet, gaben 22,4 ccm N bei 15° und 770 mm.

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5(\text{NO}_2)_3 \cdot \text{OH}$ . Ber.: N 20,8%.

(Mol.-Gew.: 404,16). Gef.: N 20,59%.

Aus dem Pikrat läßt sich das Phenylglykocyamidin rein gewinnen, indem man die wässrige, mit Schwefelsäure angesäuerte Lösung durch Ausschütteln mit Äther von der Pikrinsäure befreit, die Schwefelsäure quantitativ mit Barytwasser ausfällt und die vom Baryumsulfat abfiltrierte Lösung auf dem Wasserbad zur Krystallisation eindampft.

Trotz dieser mühsamen Reinigungsmethode gelang es

nicht, wesentlich über 10% der theoretischen Ausbeute (ca. 0.35 g aus 3 g Phenylglycin) an Phenylglykocyamidin zu erhalten.

Abänderungen der Versuchsbedingungen, unter welchen Phenylglycin und Cyanamid auf einander einwirkten, änderten nicht viel an der Ausbeute. Sie wurde nicht verbessert durch längeres Erhitzen oder Zusatz eines der beiden Reagenzien im Überschuß. Nach 5 stündigem Erwärmen auf dem Wasserbad ließ sich ein Entweichen von Ammoniak wahrnehmen. Erhitzt man nur  $\frac{1}{2}$  Stunde und setzt von Anfang an 10 Tropfen 10%iges Ammoniak zu, um der Anhydridbildung entgegen zu wirken, so bleibt die Ausbeute annähernd die gleiche.

Auch die Einwirkung der beiden Reagenzien bei Zimmertemperatur während 8 Wochen führt etwa zu dem gleichen Resultate.

Von der Annahme ausgehend, daß vielleicht die Guanidosäure selbst gebildet sein konnte, aber sich nicht isolieren ließ, wurden die alkoholischen Mutterlaugen des Phenylglykocyamidins wiederholt mit Salzsäure auf dem Wasserbade abgedampft. Es gelang aber auf diese Weise nie, zu größeren Mengen des Lactams zu gelangen, wie sowohl durch vergleichende kolorimetrische Versuche über die Stärke der Pikrinsäurereaktion als durch Wägungen des gebildeten Pikrats festgestellt wurde. Es darf deshalb wohl als höchst unwahrscheinlich bezeichnet werden, daß bei der Reaktion Phenylglykocycamin als Endprodukt auftritt.

Am schnellsten gelangt man zu dem Phenylglykocycamidin mit folgender Modifikation der Methode: 2 g Phenylglycin werden mit der gleichen Menge Cyanamid und 2 ccm Alkohol eine halbe Stunde auf dem Wasserbad im offenen Kölbchen erhitzt. Nach dem Erkalten wird mehrmals mit Äther geschüttelt, um unverändertes Cyanamid zu entfernen. Der mit Äther erschöpfte Rückstand wird in wenig heißem Alkohol gelöst. Beim Erkalten scheidet sich Phenylglykocycamidin krystallinisch aus. Die Kristalle werden abgesaugt, mit wenig kaltem Alkohol gewaschen, in wenig heißem Wasser gelöst und von geringen Verunreinigungen abfiltriert. Beim

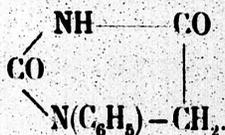
Erkalten scheiden sich sogleich etwa 10% der theoretischen Ausbeute rein aus. Die tatsächlich entstandene Menge dürfte wesentlich größer sein, denn die alkoholischen Mutterlaugen geben starke Jaffesche Reaktion. Es gelang aber nach den beschriebenen Methoden nicht, noch nennenswerte Mengen des Lactams zu isolieren. Von weiteren Versuchen wurde Abstand genommen, als sich erwies, daß das in der Einleitung erwähnte Ziel, die Darstellung und Verfütterung von Phenylglykocyamin, sich nicht erreichen ließ.

Versuche, die Guanidosäure aus Phenylglycin und Guanidincarboxylat nach der Methode von Nencki und Sieber zu erhalten, waren ohne Erfolg.

## 2. Versuche zur Umwandlung von Phenylglykocyamidin in Phenylglykocyamin (nebst Beobachtungen über die Umwandlungen von Kreatinin in Kreatin.) Bildung von Phenyl- und Methylhydantoin.

### a) Einwirkung von Barytwasser.

0,4 g Glykocyamidin wurden in 20 ccm 0,7%igem Barytwasser gelöst und am Rückflußkühler 11 Stunden lang gekocht. Schon nach 7 Stunden wurde festgestellt, daß die Jaffesche Reaktion stark abgenommen hatte und Ammoniak entwich. Die Flüssigkeit wurde nach Ausfällen des Baryts mit  $n/10$ -Schwefelsäure heiß filtriert. Beim Einengen des Filtrats schieden sich neben unverändertem Phenylglykocyamidin nadelartige Krystalle aus, die, aus Wasser umkrystallisiert, bei 192° schmolzen. Daß diese Krystalle nicht das gesuchte Phenylglykocyamin waren, ergab sich daraus, daß sie nach Erhitzen mit Salzsäure nicht die Jaffesche Reaktion gaben. Sie erwiesen sich vielmehr, wie schon der Schmelzpunkt erwarten ließ, und wie ein Vergleich mit dem synthetisch aus Harnstoff und Phenylglycin hergestellten Präparat zeigte, als das Phenylhydantoin



0,1578 g Substanz (bei 105° getrocknet): 21,6 ccm N (15°, 758 mm).

$C_9H_9N_3O_2$ . Ber.: N 15,91%.

(Mol.-Gew.: 176,08). Gef.: N 15,90%.

Die Substanz gibt mit Natronlauge und Pikrinsäure zunächst keine gelbrote Färbung. Nach einer halben Stunde etwa aber tritt eine solche ein und sie vertieft sich bei längerem Stehen immer mehr.

Ein Versuch, durch 7stündiges Erhitzen mit 1%igem Barytwasser vom Phenylglykocyamidin zum Phenylglykocycin zu gelangen, führte zu den gleichen Resultaten wie der erste. Ebenso wenig konnte die gesuchte Säure erhalten werden, wenn das Lactam mehrere Wochen mit 1%igem Barytwasser bei Zimmertemperatur oder bei 37—38° stehen gelassen wurde. Stets wurde unverändertes Ausgangsmaterial und Phenylhydantoin erhalten und schon sehr bald Ammoniakabspaltung nachgewiesen.

b) Erhitzen mit Wasser allein.

0,2 g Phenylglykocyamidin wurden mit 20 ccm Wasser am Rückflußkühler 45 Stunden im Sieden gehalten. Beim Eindampfen krystallisierte nur unveränderte Substanz aus. Die Mutterlauge war etwas gelb gefärbt.

c) Erhitzen mit Ammoniak.

Um die Ammoniakabspaltung aus dem Phenylglykocyamidin hintanzuhalten, wurde ein Versuch der Aufspaltung durch Kochen mit konzentriertem Ammoniak (Liq. ammon. caustici triplex) gemacht. Auch so konnte nur unveränderte Substanz zurückgewonnen werden.

d) Einwirkung von Bleihydroxyd auf das Chlorzinksalz.

Schließlich wurde die Methode angewandt, nach der Liebig Kreatin aus Kreatinin darstellte: 0,5 g Phenylglykocyamidin wurden in warmem Alkohol gelöst und mit alkoholischer Chlorzinklösung in das Chlorzinkdoppelsalz übergeführt. Dieses wurde mit frisch gefälltem Bleihydroxyd zersetzt. Die vom überschüssigen Bleihydroxyd, Chlorblei und Zinkhydroxyd abfiltrierte Lösung wurde eingengt, bis sich Krystalle ausschieden. Es wurde nur unverändertes Ausgangsmaterial zurückgewonnen.

Die erfolglosen Bemühungen, das Phenylglykocyamidin in das Glykocyamin zu verwandeln, gaben uns Veranlassung, mittels der kolorimetrischen Methode die Umwandlung des Lactams durch Barytwasser quantitativ zu verfolgen und diese Untersuchung auf das Kreatinin auszudehnen, da hierüber nur wenige unvollkommene Angaben von Folin<sup>1)</sup> vorliegen:

0,25 g Phenylglykocyamidin wurden in 50 ccm halbgesättigtem Barytwasser gelöst und die Stärke der Reaktion mit Pikrinsäure im Antenriethschen Kolorimeter sofort, nach 24 Stunden und 48 Stunden in der bei der Folin'schen Kreatininbestimmungsmethode üblichen Weise bestimmt. Von den Lösungen wurde ein aliquoter Teil nach dem Stehen mit Barytwasser mit Salzsäure auf dem Wasserbade 3 Stunden erhitzt, um festzustellen, wieviel in eine Verbindung übergegangen war, die sich durch Säurebehandlung in das Lactam zurückverwandeln ließ.

Die folgende Tabelle gibt über die Resultate Auskunft.

Phenylglykocyamidin + Barytwasser.

	Dauer in Stunden	Prozent	Nach HCl-Behandlung %
Versuch I	0	0,5	—
	24	0,25	0,38
	48	0,21	0,28
	72	0,21	0,28
Versuch II	0	0,25	—
	24	0,141	0,203
	48	0,115	0,216

(8 Std. mit HCl erhitzt)

Der Versuch zeigt, daß nach 24stündigem Stehen von dem Lactam 50 % verschwunden sind, ein Teil davon scheint in Phenylglykocyamin übergegangen zu sein, da der Prozentgehalt nach der Salzsäurebehandlung von 0,25 % auf 0,38 % steigt, der Rest dürfte in Phenylhydantoin oder andre Zersetzungsprodukte übergegangen sein. Dauert die Einwirkung noch länger

<sup>1)</sup> O. Folin, Festschrift für Hammarsten, Sep.-Abdr., S. 4.

an, so wird der Anteil der in das Lactam zurückverwand-  
baren Substanz noch kleiner. Diese Erfahrungen geben für die  
oben berichteten Mißerfolge, das Phenylglykocyamin zu gewinnen,  
eine ausreichende Erklärung.

Einige Aussicht auf Erfolg könnten nur Versuche haben,  
in denen das Barytwasser nicht länger als 24 Stunden auf das  
Lactam eingewirkt hat, und auch hier kann im Falle, daß eine  
Trennung der in Lösung vorhandenen Substanzen gelingt, eine  
nur so geringe Ausbeute erwartet werden, daß von weiteren  
Versuchen, das Phenylglykocyamin darzustellen, abgesehen  
wurde. Eine Substanzmenge, die für die in der Einleitung  
erwähnten, beabsichtigten Stoffwechselversuche ausgereicht  
hätte, wäre bei der schlechten Ausbeute an Phenylglykocy-  
amidin auf diesem Wege kaum zu erhalten gewesen. Bei  
noch längerer Einwirkung des Barytwassers ist nach den kolori-  
metrischen Resultaten ein noch geringerer Gehalt der Lösung an  
Phenylglykocyamin anzunehmen.

Die Umwandlung des Kreatinins in Kreatin verläuft da-  
gegen, wie die folgenden Tabellen zeigen, sehr viel glatter.  
Das zu den Bestimmungen benutzte Kreatinin wurde nach der  
Methode von Folin und Denis<sup>1)</sup> aus reinem mehrfach um-  
krystallisiertem Kreatin durch 3stündiges Erhitzen im Autoklaven  
unter 4,5 kg Druck dargestellt. Es erwies sich durch die Be-  
stimmung nach Folin (Intensität der Jaffeschen Reaktion vor  
und nach Salzsäurerehandlung) als kreatinfrei.

Ammoniakentwicklung wurde auch bei den Kreatinin-

#### Kreatinin + Barytwasser.

	Dauer der Spaltung	Prozentgehalt	Nach HCl-Behandlung %-Gehalt
Versuch I	0 Stunden	0,25	0,25
	31 „	0,08	0,228
Versuch II	0 Stunden	0,5	0,5
	13 Tage	0,14	0,435

<sup>1)</sup> O. Folin and W. Denis, Journ. of biolog. chem., Bd. 8, S. 399,  
1910.

versuchen stets beobachtet, und der Verlust an «Gesamt-kreatinin» dürfte somit wohl auch in diesem Falle ganz oder teilweise auf eine Bildung von Methylhydantoin zu beziehen sein. Aber der Anteil des verschwundenen Kreatinins, der sich durch Säurebehandlung nicht in Kreatinin zurückverwandeln ließ, beträgt beim ersten Versuch nur etwa 9%, im zweiten 13%.

Die Tatsache, daß sich Phenylhydantoin aus Phenylglykocyamidin beim Stehen mit Alkalien leicht bildet, und daß in geringerem Ausmaß vom Kreatinin ein Teil verschwindet, der nicht in Kreatin verwandelt wird, gewann Interesse, als während des Ganges dieser Untersuchungen die Arbeit Ackermanns<sup>1)</sup> über Kreatininfäulnis erschien. Unter den Fäulnisprodukten von 9 g Kreatinin fand Ackermann als einziges faßbares Produkt etwa 1 g Methylhydantoin. Es fragte sich, ob das Methylhydantoin nicht auch ohne Mitwirkung der Bakterien entstanden sein konnte. Deshalb wurde folgender Versuch ausgeführt:

1 g reines Kreatinin wurde in 200 ccm 0,75%iger sterilisierter Sodalösung (auf  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  berechnet) gelöst und zwei Wochen im Brutschrank stehen gelassen. Am Schlusse des Versuches wurde durch Abimpfen festgestellt, daß die Lösung steril geblieben war. Während des Versuchs entwickelte sich reichlich Ammoniak. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure neutralisiert, auf dem Wasserbade auf ca. 20 ccm eingengt, auf einen Gehalt von 5% Schwefelsäure gebracht und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde nach 12 Stunden abfiltriert und mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, das Filtrat in der Kälte mit gesättigtem Barytwasser von Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit. In der von den Baryumsalzen abfiltrierten Flüssigkeit wurde das Baryum sorgfältig mit Schwefelsäure ausgefällt. Da die Flüssigkeit infolge ihres Gehalts an NaOH stark alkalisch reagierte, wurde Kohlensäure bis zur neutralen Reaktion auf Lackmus eingeleitet. Die auf dem Wasserbad zur Trockne verdampfte Flüssigkeit wurde mit Methylalkohol heiß extrahiert, die methylalkoholische Lösung eingedampft und das Verfahren mehrfach

<sup>1)</sup> D. Ackermann, Zeitschrift für Biologie, Bd. 62, S. 208, 1913.

wiederholt. Das methylalkoholische Extrakt wurde in der gleichen Weise mehrfach mit 95%igem Alkohol ausgezogen. Es blieb schließlich als alkoholisches Extrakt ein hellgelber sirupöser Rückstand von 0,13 g. Er gab, mit Pikrinsäure und Natronlauge versetzt, zunächst keine Rotfärbung; nach einigen Minuten aber trat die Färbung auf, um sich dann mehr und mehr zu vertiefen.

Genau das gleiche Verhalten bei der Jaffeschen Reaktion zeigte Methylhydantoin, das wir durch Zusammenschmelzen von Sarkosin und Harnstoff darstellten. Ackermann betont in seiner Arbeit, daß Methylhydantoin die Jaffesche Reaktion gibt, ohne vom Zeitpunkt des Eintritts etwas zu erwähnen. Wir halten das langsamere Auftreten der Färbung für wichtig, weil man dadurch feststellen kann, daß eine Methylhydantoinlösung frei von Kreatinin ist.

Aus dem sirupösen Rückstand krystallisierten bei mehrtägigem Stehen im Exsikkator in der Kälte Blättchen vom Aussehen des Methylhydantoin. Da die Krystalle aber nach dem Verhalten beim Erhitzen auf dem Platinblech noch etwas Alkalisalz zu enthalten schienen, wurden sie zunächst mehrfach mit Salzsäure auf dem Wasserbade abgedampft und mit absolutem Alkohol zur Abtrennung von Kochsalz extrahiert. Der Rückstand der alkoholischen Lösung verhielt sich hinsichtlich der Jaffeschen Reaktion wie oben beschrieben. Da auch jetzt nur unvollkommene Krystallisation eintrat, wurde er in wenig Wasser gelöst, mit frisch gefälltem Silberoxyd erwärmt, filtriert, mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreit und auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wog noch über 0,1 g. Der größere Teil blieb auch nach etwa achttägigem Stehen im Exsikkator sirupös. Um die Krystalle zu gewinnen, wurde ein Teil auf Ton gestrichen. Die so farblos und trocken erhaltenen Krystalle schmolzen bei 152—154°, während eine Probe des synthetisch erhaltenen Methylhydantoin bei 155 bis 156° schmolz.

Es kann demnach kaum einem Zweifel unterliegen, daß aus Kreatinin unter der Wirkung von verdünnter Sodalösung allein Methylhydantoin entstehen kann. Daß dieser Vorgang

durch die Mitwirkung von Bakterien vielleicht beschleunigt und ausgiebiger werden kann, soll nicht bestritten werden.

### 3. Verhalten des Phenylglykocyamidins im Tierkörper.

Eine subcutane Injektion von 0,5 g Phenylglykocyamidin in wässriger Lösung bei einem Kaninchen von 1990 g ergab das erwartete Resultat, daß die Verbindung ebenso wie Kreatinin nahezu vollständig unverändert ausgeschieden wird. Die kolorimetrische Bestimmung des präformierten und Gesamtkreatinins im Harn des Versuchstieres nach Folin ergab folgende Resultate:

Datum	Harnmenge in ccm	Präformiertes Kreatinin bezw. Phenylglykocyamidin	Kreatinin aus Kreatin nach HCl-Behandlung
Tag vorher .	183	0,065	0,0038
Versuchstag	275	0,3 (Kr.) 0,49 (Ph.)	0
Nachtag . .	145	0,065	0,0138

Die Ausscheidung an präformiertem Kreatinin ist vor und nach dem Versuch genau gleich. Man wird also die Menge von 0,065 g von der Ausscheidung am Versuchstag abziehen müssen, um das Plus an unverändert ausgeschiedenem Phenylglykocyamidin zu erhalten. Dann ergibt sich eine Stärke der Reaktion, die  $0,3 - 0,065 \text{ g} = 0,235 \text{ g}$  Kreatinin oder — nach der Eichung des Kolorimeters auf Phenylglykocyamidin — 0,383 dieser Substanz entspräche, d. h. ca. 77% der eingegebenen Menge. Ob die geringe Vermehrung der «Kreatin»ausscheidung am Nachtag mit dem Versuch im Zusammenhang steht, läßt sich nicht entscheiden.

Der größte Teil des Harns vom Versuchstag wurde mit Salzsäure neutralisiert, auf dem Wasserbad zur Trockene gedampft und mehrmals mit Alkohol heiß extrahiert. Die auf 20 ccm eingeengte alkoholische Lösung wurde mit alkoholischer Pikrinsäure gefällt. Das nach 24 stündigem Stehen ausgeschiedene Pikrat wurde abgesaugt, mit wenig Alkohol und Äther gewaschen. Aus der Mutterlauge schied sich nach Einengen noch eine kleine Menge Pikrat aus. Das gesamte Pikrat wurde mit

Schwefelsäure in der Kälte zersetzt und durch Ausschütteln mit Äther von Pikrinsäure befreit. Die schwefelsaure Lösung wurde mit Baryt genau ausgefällt und das Filtrat vom Baryumsulfat auf dem Wasserbad bis zur Krystallisation eingengt. Von den ungereinigten Krystallen wurden 0,16 g erhalten. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus heißem Alkohol schmolzen sie bei 228°. Eine Stickstoffbestimmung stimmte auf die unveränderte Substanz.

0,0927 g Substanz : 19,4 ccm N (16°, 756 mm).

Ber. für  $C_6H_9N_3O$  : 24,00 %.

Gef. : 24,15 %.

#### 4. Einwirkung von Guanidin auf Phenylbromessigsäure.

Um die im theoretischen Teil besprochene Einwirkung der Phenylgruppe auf die Entstehung der Guanidosäuren bzw. ihrer Lactame zu prüfen, wurden die Versuche von Ramsay über die Einwirkung von konzentrierter Guanidinlösung auf Phenylbromessigsäure unter peinlicher Einhaltung der Versuchsbedingungen wiederholt. Statt der gelb gefärbten amorphen Substanz schieden sich aber in einer Ausbeute von 35% in Wasser sehr schwer lösliche, weiße Nadeln ab, die auch in den üblichen organischen Lösungsmitteln sich unlöslich erwiesen, sich dagegen wie das Produkt von Ramsay in heißer Salzsäure lösten und daraus mit Ammoniak gefällt wurden. Die so gereinigte, mit Wasser gut gewaschene Substanz schmolz bei 314–315°, nachdem sie gegen 300° sich schwach gebräunt hatte.

Im Vakuumexsikkator getrocknet, gab sie folgende Analysenzahlen:

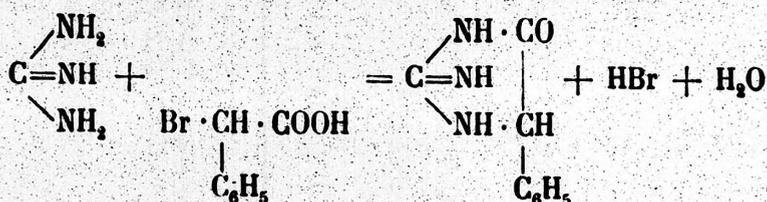
0,102 g Substanz : 20,5 ccm N (753 mm, 10°).

0,1246 „ „ : 0,2818 g  $CO_2$ , 0,0559  $H_2O$ .

$C_6H_9ON_3$ . Ber. : C 61,68%, H 5,19%, N 24,0%.

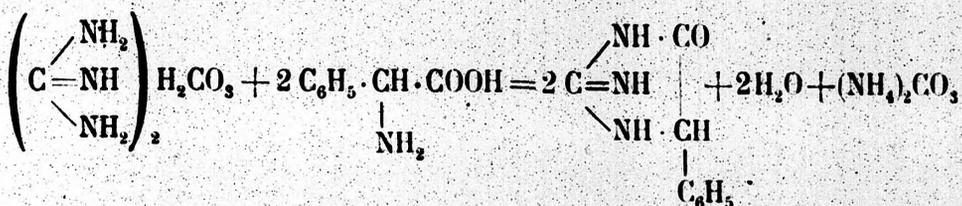
(Mol.-Gew. 175,1). Gef. : C 61,68%, H 5,02%, N 23,79%.

Die Substanz dürfte also nach der Gleichung



entstanden sein. Sie gibt die Jaffesche Reaktion nicht. Das Nitrat, das aus der salpetersauren Lösung der Base beim Einengen krystallisiert, schmolz bei 160°.

Um die Konstitution der erhaltenen Substanz sicher zu stellen, wurde sie auch durch Schmelzen von Guanidincarbonat mit Phenylaminoessigsäure nach der Methode von Nencki und Sieber dargestellt.



1,8 g Guanidincarbonat und 3 g Phenylaminoessigsäure wurden, in wenig Wasser gelöst, auf dem Sandbad erhitzt. Nachdem das Wasser größtenteils verdampft war und reichliche Entwicklung von Ammoniak und Kohlensäure stattgefunden hatte, wurde die Schmelze 3 Stunden lang bei 180° erhalten. Nach dem Auslaugen der erkalteten Schmelze mit Wasser blieb ein harziger Rückstand, der wiederholt mit Wasser heiß extrahiert wurde. Beim Stehen trübte sich die heiß filtrierte wässrige Lösung und schied einen flockigen Niederschlag ab. Von diesem wurde abfiltriert und die Lösung eingeeengt, wobei sich kurze Nadeln vom gleichen Schmelzpunkt, wie ihn die zuletzt beschriebene Verbindung zeigte, abschieden. Die beiden Substanzen erwiesen sich als identisch.

Die Analyse ergab folgende Werte:

0,1033 g Substanz : 21,2 ccm N (758 mm, 16°).

0,1686 „ „ : 0,383 g CO<sub>2</sub>, 0,0785 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ON<sub>3</sub>. Ber.: C 61,68%, H 5,19%, N 24,0%.

Gef.: C 61,96%, H 5,21%, N 23,75%.

Versuche, das Phenylglykocyamidin in Phenylglykocyamin umzuwandeln, scheiterten an der Schwerlöslichkeit in verdünnten Alkalien.

<sup>1)</sup> M. Nencki und N. Sieber, Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 17, S. 477, 1878.