

Über die Herkunft des Kreatins im tierischen Organismus.

II. Mitteilung.

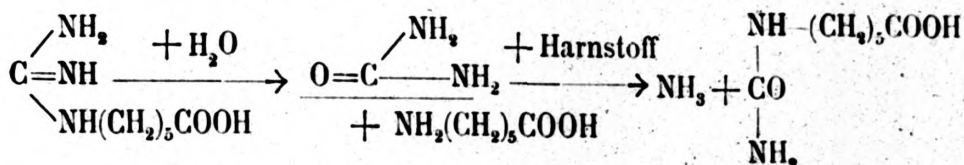
Das Verhalten der ϵ -Guanido-, ϵ -Ureido- und ϵ -Amino-n-capronsäure im Organismus des Kaninchens.

Von

Karl Thomas und M. H. G. Goerne.

(Aus dem physiologischen Institut zu Greifswald und dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Arbeitsphysiologie in Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 30. Juni 1914.)

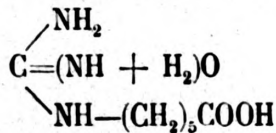
Bei der Verfütterung der ϵ -Guanidocapronsäure hatten wir erwartet, Kreatin als Endprodukt zu erhalten. Dies war nicht der Fall. Auch nicht die kleinste (kolorimetrisch gemessene) Änderung in der Ausfuhr von Kreatin und Kreatinin war in einem der Versuche zu erkennen. Außer kleinen Mengen unveränderter Guanidosäure konnte nur die entsprechende Ureidosäure aus dem Harn isoliert werden. Die Ausbeute betrug etwa 10% der Menge der verfütterten Guanidosäure. Wie ist sie entstanden? Einmal konnte die Guanidosäure, ähnlich wie das Arginin durch die Arginase, in Harnstoff und die Aminosäure zerlegt worden sein; darauf war entweder beim Eindampfen des Harns oder schon im Tierkörper aus letzterer die Ureidosäure gebildet worden.



Auf den ersten Blick erschien dieser Weg garnicht so unwahrscheinlich; denn einmal sind die Ureidosäuren, die einwandfrei im Tierkörper entstanden waren, immer aus den entsprechenden Aminosäuren gebildet worden (Phenylalanin, Tyrosin).¹⁾ Und dann erwähnt Ackermann selber die gleiche

¹⁾ Dakin, Journ. of Biol. chem., Bd. 6, S. 235; s. a. Lippich, Diese Zeitschrift, Bd. 90, S. 120, 1914; Weiland, Bioch. Zeitschr., Bd. 38, S. 385, 1912.

Möglichkeit für die Bildung von Methylhydantoin,¹⁾ das er bei der Fäulnis von Kreatinin aufgefunden hat. In unserem Falle ist so die Ureidosäure nicht entstanden. Denn bei der Verfütterung geht die Aminosäure nicht in sie über. Damit ist auch bewiesen, daß die Ureidosäure nicht als Kunstprodukt bei der Aufarbeitung des Harns entstanden ist. Selbstverständlich hatten wir von Anfang an jede Behandlung des Harns bei niedrigerer Temperatur vorgenommen, immer nur im Vakuum eingedampft usw. Deshalb muß die Ureidosäure direkt aus der Guanidosäure entstanden sein.



Die Spaltung verläuft dabei in etwas anderer Weise als bei der fermentativen des Arginins. Auf diese Beobachtung hin wird man auch die Versuche Ackermanns sicherer in der Richtung hin deuten dürfen, daß das Methylhydantoin direkt aus dem Kreatinin entstanden ist und daß dieses erst beim zweiten länger dauernden Fäulnisversuch unter Abspaltung von Sarkosin zerfallen ist. Bei uns erfolgt die gleiche Reaktion bei offener Kette. Denn bei den ϵ -Guanido- und Ureidoderivaten der n-Caprinsäure ist die Bildung eines lactamartigen Ringschlusses offenbar unmöglich. Wir haben ihn in vitro trotz besonderer darauf hinzielender Versuche nie erzielen können. Dagegen kommt er bei der Amino-n-capronsäure sehr leicht und auch noch bei den Guanido- und Ureidoderivaten der Essigsäure zustande. Im Tierkörper haben wir aber keinen Anhaltspunkt für eine derartige Reaktion gefunden.

Von der verfütterten Guanidosäure haben wir nur einen kleinen Teil als solche oder als Ureidosäure wieder auffinden können. Weitaus der größte Teil war spurlos verschwunden. Wir haben allerdings die Kohlenstoffausscheidung der Versuchstage nicht kontrolliert und können daher nur mit allem Vorbehalt annehmen, daß der Rest der Säure völlig verbrannt

¹⁾ Zeitschrift f. Biol., Bd. 63, S. 81, 1913.

worden ist. Dieser Weg geht wahrscheinlich nicht über die Ureidosäure. Sie verdankt nur einer Nebenreaktion ihr Entstehen. Die Ureidocaprinsäure haben wir uns nämlich in größerer Menge synthetisch hergestellt und in gleicher Menge wie die Guanidosäure den gleichen Tieren eingegeben; ungefähr zur Hälfte wurde sie unverändert wieder ausgeschieden. Über den Verbleib des Restes können wir nichts angeben. Vielleicht entsteht intermediär die Aminosäure oder ihr Lactam; denn als wir die Tiere mit der Ureidosäure spritzten, ähnelte ihr Verhalten demjenigen der Tiere, denen ϵ -Leucin beigebracht worden war. Sie magerten stark ab und gingen zum Teil ein. Im Harn der Tiere, die mit der Ureidosäure behandelt worden waren, konnten wir aber die Aminocaprinsäure nicht auffinden. Wir überzeugten uns, daß das Lactam der Aminocaprinsäure giftiger ist als die Aminosäure und diese giftiger wieder als die Ureidosäure. Das gleiche Verhältnis besteht auch für die γ -Aminobuttersäure und δ -Aminovaleriansäure und ihre jeweiligen Lactame. Wenn man also in dem toxischen Verhalten der Ureidosäure einen Hinweis auf den Weg ihres Abbaues im Organismus sehen will, so ist auch an die Möglichkeit der intermediären Bildung des Lactams zu denken. Wir haben es aber ebensowenig gefunden, wie die Aminosäure. Auch nicht, als wir die Aminosäure Kaninchen beibrachten. Von dieser erschienen gegen 17% unverändert im Harn wieder. Wenn also der bevorzugte Weg für den Abbau der Guanidocaprinsäure nicht über die Ureidocaprinsäure führt, so kann hierfür an einen gedacht werden, der zur γ -Aminobuttersäure führt, die offenbar leicht verbrennlich ist. Der Weg wäre entweder: Guanidocaprinsäure \rightarrow Guanidobuttersäure \rightarrow γ -Aminobuttersäure oder Guanidocaprinsäure \rightarrow Aminocaprinsäure \rightarrow γ -Aminobuttersäure.

Die erstere Reaktionsfolge hat die größere Wahrscheinlichkeit für sich, da 1. die Guanidocaprinsäure völlig indifferent für das Tier auch in großen Mengen ist, das giftige ϵ -Leucin also wahrscheinlich intermediär nicht entsteht und weil 2. die Guanidobuttersäure als einzige Guanidosäure neben dem Arginin von Leberpreßsaft gespalten werden kann. Daß die Guanido-

capronsäure von dem Ferment nicht angegriffen wird, hat der eine von uns¹⁾ bereits gezeigt. Für die Tatsache, daß auch die δ -Guanidovaleriansäure und die β -Guanidopropionsäure nicht gespalten werden, wird in der nächsten Mitteilung der experimentelle Beweis beigebracht werden.

Durch Darstellung der methylierten Guanidosäure hoffen wir Einblick in den oxydativen Abbau der Kohlenstoffkette zu erhalten. Die Synthese der Methylguanidocapronsäure ist bereits zu Ende geführt.

Experimenteller Teil.

1. Das Verhalten der ϵ -Guanidocapronsäure im Organismus des Kaninchens.

Zu den Fütterungsversuchen benutzten wir Kaninchen. Zuerst wurden sie mit Hafer gefüttert, von dem sie beliebige Mengen nehmen konnten. Unter diesen Bedingungen war aber die tägliche N-Ausscheidung im Harn²⁾ nicht gleichmäßig und ferner die Resorption der verfütterten Substanz unvollständig. Denn ein Teil unveränderter Guanidocapronsäure wurde aus den Darmabscheidungen zurückgewonnen.³⁾ Deshalb mußten in den späteren Versuchen die Tiere hungern. Kaninchen wurden zu den Versuchen gewählt, weil sie die Gewohnheit haben, beim Hungern ihren eigenen Kot wieder zu fressen. Bei ihnen war also die Wahrscheinlichkeit, daß die Guanidocapronsäure trotz ihrer geringen Löslichkeit völlig resorbiert werden würde, am größten. In der Tat konnten wir auch aus den kleinen Mengen Hungerkot dieser Tiere nie die verfütterte

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 465, 1913.

²⁾ Die Tiere wurden täglich katheterisiert und die Blase gespült.

³⁾ Extraktion der getrockneten Faeces zuerst mit Äther, dann mit Alkohol. Darauf mit salzsaurem oder essigsaurem Alkohol; der Rückstand dieses Extraktes wurde in Wasser gelöst und neutralisiert. Die ausgefallene, schwer lösliche ϵ -Guanidocapronsäure abfiltriert wieder in wenig Säure gelöst, die Lösung mit essigsaurem Quecksilber und Soda gereinigt, aus dem Niederschlag das Chlorhydrat der Guanidocapronsäure dargestellt, dessen Schmelzpunkt (163—165°) der erwartete war und die Mischprobe bestand.

Substanz wieder gewinnen. Die Kreatininausscheidung im Harn zeigte keinen Anstieg. Wir haben mehrere Versuche durchgeführt;¹⁾ sie im einzelnen anzuführen, erübrigt sich bei ihrem negativen Ergebnis in dieser Beziehung. Nur für einen seien die Kreatininwerte²⁾ aufgeführt. Sie betragen in der Vor- und Nachperiode 176, 181, 166 und 171 mg = 174 mg im Mittel für den Tag, in der Hauptperiode, wo an den ersten 2 Tagen je 4,2 g Guanidocaprinsäurechlorhydrat mit Natronlauge neutralisiert per os gegeben worden waren, 169, 173, 161, 195 = 177 mg im Mittel. Der Urin wurde im wesentlichen nach den Angaben von Jaffé³⁾ verarbeitet; das Kreatinin wurde über das Kaliumpikratdoppelsalz gereinigt. Zur Wägung kamen 0,0377 g Zinksalz mit einem Gehalt von 16,45% ZnO (statt 22,4%); ferner ungefähr 0,8 g unveränderte Guanidocaprinsäure, als Chlorhydrat und Chloraurat isoliert und durch Bestimmung des Schmelzpunktes und der Analyse des Chlorhydrates identifiziert.⁴⁾ Niedere Homologe der Guanidocaprinsäure, besonders die γ -Guanidobuttersäure und die Guanidoessigsäure waren trotz allen Suchens in keiner Fraktion zu finden. Deshalb wurde der Versuch mit mehr Substanz wiederholt. Ein hungerndes Kaninchen (3,8 kg) bekam im Laufe von 5 Tagen 15,6 g ϵ -Guanidocaprinsäure durch die Schlundsonde zugeführt. Der Urin wurde noch 5 weitere Tage gesammelt und wie weiter unten angegeben wird, verarbeitet. Dabei wurden ungefähr 3 $\frac{1}{2}$ g unveränderte Guanidocaprinsäure, frei von niederen Homologen isoliert, ferner 0,41 g rohes Kreatin,

¹⁾ Die zwei ersten wurden von dem einen von uns (Thomas) bereits im Sommersemester 1911 im Tübinger physiologisch-chemischen Institut durchgeführt.

²⁾ Das Kreatin wurde nicht bestimmt, da seine Überführung im Kaninchenharn, der mit dem Spülwasser der Blase stark verdünnt war, doch nicht quantitativ erfolgt wäre.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 430, 1906 Die genaue Beschreibung der Arbeitsmethode, zu der wir im Laufe der Zeit gekommen sind, erfolgt unten.

⁴⁾ 0,1237 g Substanz geben mit Silbersulfat bei Gegenwart von Schwefelsäure 0,0852 g AgCl, enthalten also 17,03% Cl (berechnet für $C_7H_{15}N_3O_2 \cdot HCl$ 16,93%); das Filtrat nach Kjeldahl behandelt ergibt 20,40% N (ber. 20,06%).

die nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser 0,30 g reines¹⁾ Kreatin geben und 1,07 g einer in kaltem Wasser schwer löslichen, mit Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Säure. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser waren von ihr 0,63 g feine, fast weiße Nadeln vorhanden; bei 178—179° schmelzen sie und zersetzen sich unter Gasentwicklung. Dieser Schmelzpunkt ändert sich bei weiterem Umkrystallisieren nicht. N-Gehalt 14,93%. Mit 0,21 g der gleichen Substanz, die aus der Mutterlauge später gewonnen worden waren, wurde noch einmal unter Zusatz von Tierkohle aus Wasser umkrystallisiert, scharf im Vakuum über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann analysiert.²⁾

1. 7.018 mg geben 12,632 mg CO_2 und 5,560 mg H_2O ;
 4.285 „ „ 0,558 ccm N bei 20° und 719 mm.
 Gef. 49,09% C 8,86% H 14,00% N.

2. Nach nochmaligem Trocknen:

a) 7,590 mg geben 13,452 mg CO_2 und 5,925 mg H_2O

b) 5,305 „ „ 9,415 „ „ „ 4,235 „ „

c) 5,495 „ „ 9,760 „ „ „ 4,410 „ „

d) 8,040 „ „ 14,340 „ „ „ 6,060 „ „

gef.: a) 48,33% C 8,73% H

b) 48,40% „ 8,93% „

c) 48,44% „ 8,95% „

d) 48,64% „ 8,43% „

Ber.: für Ureidocapronsäure $C_7H_{14}O_3N_2$ C 48,27%, H 8,05%, N 16,10%
 „ „ Methylureidocaprons. $C_5H_{16}O_3N_2$ „ 51,06% „ 8,51% „ 14,90%
 „ „ Aminocapronsäure $C_6H_{13}O_2N$ „ 54,96% „ 9,90% „ 10,69%.

Da der Schmelzpunkt unserer Substanz sich beim Umkrystallisieren nicht mehr verändert hatte, hielten wir sie für einheitlich. Die Analyse stimmte einigermaßen auf eine Methylureidocapronsäure. Damit isomer ist ϵ -Leucylglycin. Beim Versuch, auf die Substanz die Erlenmeyer-Spirosche Reaktion³⁾ zum Nachweis des Glycinrestes anzuwenden, konnte weder ein Lactimid, noch die Phenylbrenztraubensäure gefaßt werden. Wir wiederholten daher den Fütterungsversuch mit einer größeren

¹⁾ 0,2927 g verlieren im Vakuum über P_2O_5 0,0354 g = 12,09% H_2O (ber. 12,07%) 0,0905 g der krystallfreien Substanz enthalten 20,75 ccm $n_{10}NH_3$, also 32,10% N (ber. 32,06%).

²⁾ Die Analysen verdanken wir Herrn Dr. H. Weil in München.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 28, S. 177, 1899.

Menge Guanidocaprönsäure.¹⁾ Dabei fanden wir erst die Erklärung für das eigentümliche Verhalten unserer aus dem Harn isolierten Substanz. Es handelt sich einfach um die ϵ -Ureidocaprönsäure; diese verträgt aber schon das Trocknen im Vakuum bei Zimmertemperatur (vielleicht auch das Umkrystallisieren aus heißem Wasser) nicht. Was wir in Händen hatten, war offenbar ein Gemenge von viel Ureido- und wenig Aminocaprönsäure gewesen.

11 hungernden Kaninchen (1700—2000 g Anfangsgewicht) werden täglich 2 g Guanidocaprönsäure durch die Schlundsonde beigebracht. Im ganzen werden 125,5 g davon verfüttert. Der Harn, der 2 Tage länger gesammelt wird, wird über Chloroform aufbewahrt. Es werden mit dem Spülwasser der Käfige 7000 ccm erhalten mit 82,9 g N; zur Reinigung wird mit Bleizucker gefällt, wozu ungefähr 1 l einer 20%igen Lösung gebraucht werden. Filtrat und Waschwasser (ungefähr 10 l) wird mit Schwefelwasserstoff und dann mit einem Luftstrom behandelt; und wieder filtriert. Darauf wird im Vakuum eingeengt. Das Schwefelblei läuft beim Filtrieren kolloidal mit durch. Die auf ein handliches Volumen gebrachte Flüssigkeit wurde daher mit geglühter Kieselgur geschüttelt und abgesaugt.²⁾ Das Filtrat davon enthielt 81,06 g N. Es

¹⁾ Das hierzu gebrauchte Cyklohexanon schenkte mir in vorzüglicher Reinheit die Badische Anilin- und Sodafabrik, wofür ich ihr auch hier danken möchte.

²⁾ Der Niederschlag wird getrocknet und mit HCl enthaltendem absolutem Alkohol wiederholt ausgekocht. Das alkoholische Filtrat enthält 2,45 g N. Es wird im Vakuum zur Trockene eingedampft, der Rückstand in heißem Wasser aufgenommen und mit Kalilauge neutralisiert und in die Kälte gestellt. Der entstandene Niederschlag (8,0 g) wird aus 30 ccm konzentrierter Salzsäure krystallisiert. Es werden 8,2 g feine weiße Nadeln vom Schmp. 163—165° erhalten. Sie werden aus Alkohol umkrystallisiert, ins Chloraurat übergeführt, wobei mehrmals durch einen Unfall der größte Teil der Substanz verloren ging. Schließlich wurden 8,2 g Chloraurat erhalten, die einmal aus Wasser umkrystallisiert den für Guanidocaprönsäurechloraurat verlangten Goldgehalt aufweisen, aber um 10° niedriger schmelzen (155°) und diesen niedrigen Schmelzpunkt auch bei weiterem Umkrystallisieren beibehalten. Gemischt mit dem bei 165° schmelzenden synthetischen Guanidocaprönsäurechloraurat schmelzen sie bei 158—162°.

0,2032 g gewichtskonstantes Aurat hinterlassen 0,0782 g Glührückstand; gef.: 38,48% Au; ber.: 38,43%.

wird zur Trockene eingedampft, die letzten Reste Wasser durch zweimaliges Zugeben von Methylalkohol und Wiedereindampfen entfernt. Der zurückbleibende Sirup geht in warmem Methylalkohol zum größten Teil in Lösung. Nach eintägigem Stehen wird abgesaugt; ¹⁾ im Filtrat sind 75,8 g N. Der Methylalkohol wird verdampft; der Rückstand in 4 l Wasser aufgenommen, sodaß die Lösung ungefähr 2% Harnstoff enthält, und bei schwefelsaurer Reaktion (4 Volumenprozent) mit Phosphorwolframsäure gefällt. Es wird soviel davon zugesetzt, daß eine 5%ige Phosphorwolframsäure keine weitere Fällung mehr gibt. Im ganzen werden 2800 ccm einer 20%igen Lösung gebraucht. Nachdem das Gemisch über Nacht im Eisschrank gestanden, wird abgesaugt, das Filtrat in der üblichen Weise mit Baryt zerlegt und schließlich im Vakuum so stark eingeengt, daß der Harnstoff bei Zimmertemperatur eben gelöst bleibt. Nach 14 Tagen war die Krystallisation beendet. Es wird abgesaugt und nacheinander mit kaltem Wasser, Alkohol und Äther auf der Nutsche gewaschen. Ausbeute lufttrocken 11,5 g, Smp. 163—175° unter Zersetzung; der Mischschmelzpunkt ergibt, daß die Substanz identisch ist mit der im vorigen Versuch erhaltenen, die sich aber bei 178—179° zersetzte. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser (200 ccm), das erste Mal unter Zusatz von Tierkohle, zersetzt sich die Substanz im zugeschmolzenen Röhrchen bei 174—179°. Ausbeute 8,7 g. ²⁾

N-Gehalt 15,35%; Ureidocaprinsäure verlangt 16,10% N. Darauf wird noch einmal mit heißem Wasser krystallisiert. Der Schmelzpunkt beträgt jetzt 178—179° (im geschlossenen Röhrchen). Der N-Gehalt (nach Kjeldahl) ist für die im nicht evakuierten Exsikkator 2 Tage über Schwefelsäure getrockneten Substanz 15,85%; nach Dumas 16,52%. ³⁾

Nach nochmaligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser

¹⁾ Der Rückstand enthält keine Guanidocaprinsäure.

²⁾ Aus den gesamten Mutterlaugen werden noch 1,61 g (Schmp. 168°) gewonnen.

³⁾ 0,1296 g geben 20,3 ccm N bei 20° und 705,5 m
Gef.: 16,52% N.

und Trocknen über CaCl_2 , 15,37% N nach Kjeldahl. Der Gehalt an Kohlenstoff und Wasserstoff war etwas zu hoch.¹⁾

Zur weiteren Identifizierung als ϵ -Ureidocaprinsäure wurde diese nach Lippich aus der Aminosäure hergestellt (s. unten). Sie zeigte völlig gleiches Verhalten wie die Substanz aus Harn, beide gemischt zersetzten sich ohne Depression. Ferner wurde die Harnsubstanz gespalten und in dem Reaktionsgemisch die ϵ -Aminosäure als Benzolsulfoverbindung nachgewiesen.

2 \times 0,87 g der Substanz aus Harn werden mit 3,5 g Barythydrat und 25 ccm Wasser 4 Stunden im Rohr auf 140° erhitzt. Beim Öffnen besteht kein Druck; das Reaktionsgemisch der beiden Röhren wird vereinigt, mit CO_2 gesättigt und unter Durchblasen von Luft solange gekocht, bis kein Ammoniak mehr entweicht. Das Filtrat wird zur Trockene eingengt. Der Rückstand (1,43 g ber. 1,31 g) wird in 12 ccm $n/1$ -KOH gelöst, mit 7,5 g Benzolsulfochlorid und 18 ccm 22%iger KOH in Portionen geschüttelt. Dann wird filtriert und angesäuert. Es fallen 2,26 g weiße Nadeln. Schmp. 116—118°; aus 135 ccm heißem Wasser umkrystallisiert 1,34 g, Schmp. 118—120,5°. Benzolsulfo- ϵ -Leucin verlangt 120—122°. ²⁾ N-Gehalt nach Kjeldahl 5,11% (ber. 5,17%). 0,1546 g geben 0,2996 g CO_2 und 0,0873 g H_2O . Gef.: 52,85% C, 6,32% H, ber.: 53,12% C, 6,27% H.

0,1492 g geben	0,1303 g BaSO_4 (Carius) gef.	12,00 S)	ber.
0,1533	>	0,1323	>	11,85
)	11,81% S.

Die Mutterlauge der Ureidocaprinsäure sowie die Phosphorwolframsäurefällung wurden bei alkalischer Reaktion mit Chloroform extrahiert. Wenn das Lactam der Aminocaprinsäure vorhanden war, mußte es jetzt im Rückstand des Chloroformauszugs enthalten sein. Dieser bestand aber nur aus Spuren eines braunen Öls und wurde verworfen. Die mit Chloroform extrahierten Lösungen wurden mit Baryt (und Harnstoff) gekocht, damit allenfalls vorhandene Aminosäure als Ureidosäure ausfiel. Es wurde jedoch in beiden Fällen keine gefunden.

Bei der Verfütterung von 125,5 g Guanidocaprinsäure wurden also ca. 8 g (= 6,4%) unverändert zurückgewonnen, 10,3 g (= 8,2%) waren in die Ureidosäure übergegangen; dafür daß ein weiterer Teil in die Aminosäure oder ihr Lactam

¹⁾ 0,1205 g geben 0,2154 g CO_2 und 0,088 g H_2O
 Gef.: 48,94% C 8,20% H
 Ber.: 48,25% > 8,05% >

²⁾ v. Braun, Chem. Ber., Bd. 40, S. 1839, 1907.

übergegangen war, konnte kein Anhaltspunkt gefunden werden. Der größte Teil der verfütterten Säure wird also vollständig verbrannt worden sein.

II. Die ϵ -Ureidocaprinsäure und ihr Verhalten im Organismus des Kaninchens.

1. Darstellung und Eigenschaften.

Lippich¹⁾ hat in einer Reihe von Mitteilungen die Uramidosäuren der natürlich vorkommenden α -Aminosäuren durchforscht. Für ihre Darstellung gibt er zwei neue Wege an; einmal wird die Aminosäure mit Harnstoff und überschüssigem Baryt, das zweite Mal nur mit Harnstoff gekocht. Während letztere Methode mehr von analytischem Interesse ist, eignet sich die erste besser zur Darstellung im großen; hier ist am Schluß aller überschüssig zugesetzter Harnstoff entfernt; die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches also einfacher, auch benötigt die Reaktion kürzere Zeit. Wir wählten deshalb diesen Weg, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß sowohl das ϵ -Leucin wie auch die Ureidocaprinsäure das Kochen mit Barytlösung vertragen.

20 g nicht ganz chlorhydratfreies Leucin²⁾ werden mit 85 g Harnstoff, 300 g Barythydrat und 800 ccm Wasser im 2 l-Rundkolben 8 Stunden am Rückfluß gekocht. Dann wird das noch heiße Reaktionsgemisch mit CO_2 gesättigt, das Baryumcarbonat abgesaugt und das Filtrat auf dem Wasserbad eingedampft. Der Versuch wird 4mal wiederholt, die Filtrate gemeinsam verarbeitet. Nachdem die auf ein kleines Volumen eingeeengte Flüssigkeit nochmals von etwas Baryumcarbonat befreit worden ist, wird mit Eisessig angesäuert. Es fallen sofort weiße Nadeln. Nach 3stündigem Stehen im Eis wird abgesaugt, mit kaltem Wasser, 94%igem Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute lufttrocken 97,6 g = 88,3% der Theorie. Bei 171—174° zer-

¹⁾ B. B., Bd. 39, S. 2953, 1906. — Ebenda, Bd. 41, S. 2974, 1908. — Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 278, 1910. — Ebenda, Bd. 90, S. 124, 1914.

²⁾ Wir haben das Chlorhydrat der ϵ -Aminocaprinsäure nicht mit Silberoxyd (wie Wallach, Ann., Bd. 312, S. 187, 1910, angibt), sondern mit Bleioxyd behandelt; das Filtrat davon wurde mit H_2S entbleit und zur Darstellung der Ureidosäure benutzt.

setzt sich die Substanz unter Gasbildung, sie ist frei von Baryum und Krystallwasser. N-Gehalt nach Kjeldahl 15,93% (ber. 16,10). Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser zersetzt sich die Substanz im geschlossenen Röhrchen bei 174 bis 178°. Der Zersetzungspunkt ist nicht konstant, die Substanz scheint sich schon beim Trocknen zu verändern. Die aus Harn isolierte und mehrfach umkrystallisierte Säure gibt im Vakuum über P_2O_5 bei 80° getrocknet 15,07% N, desgl. bei Zimmertemperatur getrocknet 15,42% N und im nicht evakuierten Exsikkator nach 2-tägigem Stehen über Schwefelsäure 15,85% N. Nach einmaligem Krystallisieren aus heißem Wasser und Trocknen über $CaCl_2$ 15,37% N. (Alle N-Bestimmungen nach Kjeldahl.) Auch Lippich scheint bei der α -Ureidocaprinsäure darunter zu leiden gehabt zu haben. Die farblose Schmelze, löst sich in heißem Wasser, sie gibt die Biuretreaktion nicht.

Die Ureidocaprinsäure ist gut löslich in heißem Wasser, wenig löslich in kaltem Wasser und Alkohol, nicht löslich in Äther, Aceton und verdünnten Säuren; dagegen löst sie sich leicht in verdünnten Alkalien, auch in Soda. Die wässrige Lösung verbraucht bei der Titration die auf eine Carboxylgruppe berechnete Menge Kalilauge. 50 ccm einer Lösung, die in 100 ccm 0,1720 g Ureidocaprinsäure enthält, werden durch 4,85 ccm $n/10$ -KOH neutralisiert (Methylrot), verlangt sind 4,95 ccm. Sie gibt keine Fällung mit Phosphorwolframsäure, Pikrinsäure, Pikrolonsäure und mit den Acetaten der Schwermetalle, auch nicht mit Silbernitrat und Baryt; wohl aber mit Mercuriacetat und Soda nach Neuberg, mit Mercurinitrat sowie vollständig mit Mercurinitrat und Soda nach Liebig, die Fällung ist löslich in überschüssigem Alkali. Die Ureidosäure zersetzt sich mit salpetriger Säure unter Gasbildung und entwickelt mit Bromlauge im Hüfnerapparat langsam, aber vollständig 2 Atome Stickstoff. ¹⁾

¹⁾ 5,25 ccm einer Lösung, die in 100 ccm 2,444 g Ureidocaprinsäure enthält, entwickelt im Laufe von 22 Stunden 17,1 ccm N_2 bei 17° und 757 mm; desgl. 18,4 ccm bei 18° und 757 mm;

gefunden: 15,53% N;
16,40% N; berechnet: 16,10%.

Mit der doppelten Menge Normalkalilauge unter Durchleiten von Luft entwickelt die Ureidosäure ganz langsam Ammoniak. Nach 45 Stunden ist die Zersetzung noch nicht beendet, ϵ -Leucin konnte aber mit Hilfe von Benzolsulfochlorid nicht nachgewiesen werden. Dagegen erfolgt die Spaltung in dem gewünschten Sinn mit Hilfe von Baryhydrat beim Erhitzen unter Druck.

2,47 g Ureidocaprinsäure + 7,0 g Baryhydrat + 50 ccm Wasser 4½ Stunden bei 140°. Beim Öffnen kein Druck, das farblose Reaktionsprodukt riecht nach Ammoniak; es wird mit CO₂ gesättigt, unter Durchleiten von Luft erwärmt, bis kein Ammoniak mehr entweicht; vom Baryumcarbonat abfiltriert und eingedampft. Es werden 2,1 g eines schön weißen Rückstandes erhalten, der bei 199—201° schmilzt und bei der Mischprobe mit ϵ -Leucin keine Depression des Schmelzpunktes zeigt; 0,60 g davon wurden in wässriger Kalilauge mit Benzolsulfochlorid behandelt; nach dem Ansäuern fallen 0,85 g feine weiße Nadeln, die bei 115—119°, nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser bei 116—120° schmelzen; Benzolsulfonyl- ϵ -Leucin verlangt 120—122°. ¹⁾ Die Mischprobe ergibt die Identität unserer Verbindung damit, ihr N-Gehalt nach Kjeldahl ist 5,08% (ber. 5,17%).

Lippich hat gezeigt, daß seine α -Ureidosäuren durch Mineralsäuren sehr leicht in die Hydantoine übergehen. Die ϵ -Ureidocaprinsäure tut dies nicht; sie kann 2 Stunden mit konzentrierter Salzsäure gekocht werden, ohne daß ätherlösliche Substanzen entstehen. Wenn die wässrige Lösung mehrmals zur Entfernung der Salzsäure im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand dann mit warmem Wasser aufgenommen wird, so krystallisiert daraus sofort die unveränderte Ureidosäure wieder (Schmelzp. 176°) aus.

2. Verhalten der ϵ -Ureidocaprinsäure im Organismus des Kaninchens.

44 g der Säure werden Kaninchen subcutan beigebracht; jedes Tier erhält täglich 2 g in 50—100 ccm destilliertem Wasser gelöst. Daneben konnte es Hafer nach Belieben fressen. Im ganzen wurden 8 Tiere gebraucht, von denen 4 während des Versuchs (gewöhnlich am Tage der 3. Injektion) starben. Der

¹⁾ v. Braun, loc. cit.

Urin sämtlicher Tiere wurde über Chloroform gesammelt (bei den gestorbenen noch aus der Blase entnommen) und auf einmal nach dem oben geschilderten Verfahren verarbeitet. An die Reinigung mit Bleizucker schloß sich das Einengen im Vakuum an. Aus der auf etwa 250 ccm eingeeengten Flüssigkeit fielen nach Ansäuern mit Schwefelsäure 24,9 g der verfütterten Ureidocaprinsäure, Zersetzungspunkt im zugeschmolzenen Rohr bei 168—172°. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser zersetzen sie sich bei 175°. N-Gehalt nach Kjeldahl 15,41%. Ausbeute 21,15 g. Das von der Ureidocaprinsäure befreite und mit Wasser verdünnte Filtrat wird mit Phosphorwolframsäure gefällt und beide Fraktionen getrennt auf das Vorhandensein von Lactam der ϵ -Aminocaprinsäure sowie auf das der Säure selbst untersucht. (Überführung in die Ureidosäure, im ersten Fall nach vorheriger Extraktion der alkalischen Lösung mit Chloroform.) Es konnte aber keiner der beiden Körper nachgewiesen, überhaupt kein Aufschluß über den Verbleib der fehlenden 50% der verfütterten Ureidosäure erhalten werden.

III. Verhalten der ϵ -Aminocaprinsäure im Organismus des Kaninchens.

Die Substanz ist nicht indifferent; einem Kaninchen (1,6 kg) werden 2,4 g ϵ -Leucin subcutan beigebracht, nach 10 Stunden ist es tot. Die Sektion ergibt Hyperämie der Lungen, prall gefüllte Vorhöfe, Ventrikel leer und kontrahiert, (nicht entzündliches) Ödem an der Injektionsstelle. 5 weitere Tiere (2,2—2,4 kg) erhalten insgesamt 13,0 g ϵ -Leucin in 10%iger Lösung und in täglichen Dosen von 0,5 g subcutan 5 Tage lang. Die Tiere werden während dieser Zeit mit Hafer gefüttert, nehmen aber stark ab. Der Harn wird 3 Tage länger (bis zum Tod der Tiere) gesammelt. Er wird nach dem gleichen Verfahren aufgearbeitet, wie es S. 195 ff. geschildert ist. Nur werden die jeweiligen Filtrate nicht im Vakuum, sondern in Schalen auf dem Wasserbad oder auf dem Gasofen eingeeengt. Trotzdem krystallisiert keine Spur von Ureidocaprinsäure aus und damit ist der sichere Beweis geliefert, daß die nach Verfütterung der Guanidosäure aufgefundene Ureidosäure direkt aus dieser, nicht

über die Aminosäure entstanden ist und daß sie auch nicht als Kunstprodukt gebildet bei der Verarbeitung des Harns aufgefaßt werden darf.

Phosphorwolframfällung (sie wird zuerst aus heißem schwefelsäurehaltigem Wasser krystallisiert und nur der Teil, der beim Erkalten wieder auskrystallisierte, verarbeitet) und -filtrat werden, nachdem sie ungefähr $\frac{1}{2}$ Jahr, ohne einen Niederschlag (Ureidosäure) abzusetzen, gestanden haben, mit Chloroform geschüttelt. Das Lactam der ϵ -Aminocaprinsäure war nicht nachzuweisen. Darauf wurde mit überschüssigem Baryt und Harnstoff 6 Stunden am Rückschluß gekocht. Dann wird mit Kohlensäure vom Baryt befreit und eingeengt. Beim Ansäuern mit Essigsäure (nicht beim Ansäuern mit Salzsäure) fällt die Ureidosäure. Aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag werden 0,71 g Ureidosäure (Schmelzp. 167°) erhalten, die nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser bei 174° gemischt mit Ureidocaprinsäure bei 179° schmelzen und 16,04% N (nach Kjehldahl) enthalten (erwartet 179° und 16,10% N).

Aus dem Phosphorwolframsäurefiltrat werden in gleicher Weise die Ureidosäure, 2,3 g Rohprodukt, 1,5 g nach einmaligem Krystallisieren aus heißem Wasser erhalten und ebenfalls durch Mischprobe, N-Bestimmung (15,83%) und nach der Spaltung als Benzolsulfo- ϵ -Leucin als solche identifiziert.

Das Phosphorwolframat der ϵ -Aminocaprinsäure ist also in schwefelsaurer Lösung nicht so ganz unlöslich, wie es Abderhalden¹⁾ für das der γ -Aminobuttersäure angegeben hat und wie es von E. Fischer und Bergmann²⁾ bei der δ -Methylaminovaleriansäure beobachtet worden ist.

Von der verfütterten Aminocaprinsäure sind also insgesamt 2,26 g = 17,4% unverändert wieder ausgeschieden worden. Für einen Übergang ins Lactam und in die Ureidosäure wurde kein Anhaltspunkt aufgefunden. Der größte Teil der Säure muß verbrannt worden sein.

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

²⁾ Liebigs Ann., Bd. 398, S. 96, 1913.