

Zur Methodik der Fleischextraktuntersuchung.

Von

J. Smorodinzew.

(Der Redaktion zugegangen am 19. Juni 1914.)

Um die Basen aus dem Fleischextrakt auszuschneiden, benutzt man ihre Eigenschaft, von Phosphorwolframsäure gefällt zu werden; die Bedingungen aber, unter denen diese Fällung am vollkommensten vor sich geht, bleibt bislang nicht ganz aufgeklärt. Manche Autoren raten, die Basen bei Gegenwart einer gewissen Menge Schwefelsäure zu fällen, andere halten den Zusatz dieser Säure für überflüssig. Viele empfehlen zur Entfernung der Beimengungen, das Extrakt zuerst mit neutralem Bleiacetat zu behandeln: wie aber Wl. Gulewitsch¹⁾ als erster gezeigt hat, tritt das Vorhandensein essigsaurer Salze der vollständigen Fällung der wichtigsten Base des Extrakts, des Carnosins, durch Phosphorwolframsäure hinderlich entgegen. In vorliegender Arbeit ist der Versuch gemacht worden, den Einfluß der Bleisalze und der Schwefelsäure auf die Ausbeute der Basen bei einer parallel durchgeführten vergleichenden Untersuchung verschiedener Portionen eines und desselben Extrakts wenigstens annähernd aufzuhellen, wie auch die Phosphorwolframsäure bei der Ausscheidung der Basen durch Quecksilberoxydsulfat zu ersetzen. Den ersten Versuch, durch die Fällung mit Quecksilbersulfat Carnosin auszuschneiden, führte ich auf Herrn Prof. Dr. Wl. Gulewitschs Vorschlag hin am Leberextrakt aus.²⁾ Es erwies sich darin kein Carnosin, und fielen nur Purinkörper, Kreatinin und ein Teil des Methylguanidins aus.

Zu diesem Zweck wurde auf übliche Weise aus Fleisch vom Schenkel eines frischgeschlachteten Ochsen ein Extrakt durch 15—20 Minuten langes Auskochen von 18 kg gehackten Muskeln mit Wasser bereitet. Nach dreimaligem Extrahieren

¹⁾ Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 9 (1913).

²⁾ J. Smorodinzew, Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 218 (1912).

wurden 75 l des wässerigen Extrakts erhalten, welches durch Einengung auf dem Wasserbade bis auf 4 l gebracht wurde, und es wurden zwei Proben von je 5 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl genommen.

I. Die aus zwei Proben von je 5 ccm erhaltene Ammoniakmenge entsprach 72,25 resp. 72,30 ccm $\frac{1}{10}$ -N-H₂SO₄, was 81,04 g N im Gesamtextrakt und 0,45% des Gewichts des in Arbeit genommenen Fleisches entspricht.

Darauf wurde die Flüssigkeit in vier gleiche Portionen geteilt, welche weiter gesondert untersucht wurden.

I. Portion des Extrakts.

Diese Portion wurde ohne eine vorherige Fällung mit Bleizucker mit einer 10%igen Quecksilberoxydsulfatlösung in 5%iger Schwefelsäure gefällt. Nach 7 Tagen wurde der Quecksilberniederschlag abfiltriert, ausgewaschen und mit einem Schwefelwasserstoffstrom zersetzt.

A. Quecksilberniederschlag.

Silberniederschlag. Nach der Entfernung des Quecksilbersulfids wurde das Filtrat bei neutraler Reaktion bis auf 200 ccm gebracht und mit Silbernitrat gefällt. Die Fällbarkeit durch ammoniakalische Silbernitratlösung, die Xanthin- und die Weidelsche Probe zeigten, daß in dieser Fraktion Purinbasen enthalten sind; die freien Purinkörper wogen 2,8 g.

Erster Silberbarytniederschlag.¹⁾ Aus dem Filtrat des Silberniederschlags der Purinkörper wurde durch Zusatz von warmer Barythydratlösung eine Carnosinfraktion erhalten. Es gelang, 14,3 g freies Carnosin mit dem Zersetzungspunkt 236—238° aus dieser Fraktion auszukristallisieren. Nach zweimaligen Umkristallisieren aus heißem Wasser und nachfolgendem viermaligem Umkristallisieren durch Zusatz von Alkohol zur kalten wässerigen Lösung des Carnosins erreichte die Zersetzungstemperatur 245—246°. Ein Teil dieser Frak-

¹⁾ Bei der Gewinnung der Carnosin enthaltenden Fraktionen hat mir Herr A. Anzygin seinen Beistand geliehen, wofür ich ihm meinen Dank ausspreche.

tion, der bis zum konstanten Gewicht im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet wurde, wurde zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens benutzt.

II. 0,9544 g der Substanz wurden bis 16,9640 g aufgelöst: $p = 5,626\%$; $c = 5,727\%$ ($d = 1,0179$ angenommen); ¹⁾ $\alpha_{546}^{17^\circ} = + 2,89^\circ$ bei $l = 2$ dm; woraus $[\alpha]_{546}^{17^\circ} = + 25,2^\circ$ anstatt $25,32^\circ$ berechnet wurde.

Zweiter Silberbarytniederschlag. Hier wurden 0,39 g des Pikrats mit 199—200° Schmelzpunkt gefunden, was 0,094 g freien Methylguanidins entspricht.

Wismutjodidniederschlag — diese Fraktion erwies sich als in Alkohol unlöslich, so daß es nicht gelang, einen Sublimatniederschlag zu erhalten.

B. Quecksilberfiltrat.

Es wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, und das Filtrat vom Quecksilbersulfid mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der erhaltene Niederschlag wurde auf übliche Weise untersucht.

Erster Silberbarytniederschlag. In dieser Fraktion krystallisierte keine freie Base aus; diese wurde in das salpetersaure Salz übergeführt und dann in Krystallen erhalten. Zersetzungspunkt ca. 230°. Außerdem wurde hier durch entsprechende Reaktionen das Vorhandensein von Kreatin und Kreatinin dargetan und ein Pikrat mit Zersetzungspunkt über 270° (nach viermaligen Umkrystallisieren) isoliert. Die Gegenwart von Carnosin wurde nicht beobachtet.

Zweiter Silberbarytniederschlag. Es wurden 3,84 g Methylguanidinnitrat erhalten, welche nach dem Umkrystallisieren bei 150° schmolz.

Der Wismutjodidniederschlag gab 7,2 g einer Sublimatverbindung des Carnitins, was 1,64 g der freien Base entspricht mit dem Schmelzpunkt 196—197°.

Die Daten dieses Versuchs zeigen, daß der Quecksilberniederschlag Purinbasen und Carnosin und das Quecksilberfiltrat — Kreatin, Kreatinin, Methylguanidin und Carnitin enthielt, welche durch das Quecksilbersulfat nicht gefällt worden

¹⁾ Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 10, Beob. XXI (1913).

waren. Folglich gelingt es, durch dieses Verfahren die Basen des Extrakts zu trennen.

II. Portion.

Diese wurde zuerst mit neutralem Bleiacetat behandelt und das Filtrat nach der Abscheidung des Bleisulfids mit 40%iger Phosphorwolframsäure ohne Zusatz von Schwefelsäure gefällt.

Silberniederschlag. Purinkörper, die auf die übliche Weise identifiziert wurden, betragen ca. 0,5 g.

Erster Silberbarytniederschlag. Aus dieser Fraktion wurden 14 g Carnosin mit dem Zersetzungspunkt 236—238° auskrystallisiert. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren wurde die spezifische Drehung des Präparats bestimmt, welches sich bei 240—241° zersetzte.

III. 0,9520 g der Substanz wurden in Wasser zu 16,9352 g gelöst; $p = 5,621\%$; $c = 5,722\%$; $\alpha_{546}^{17^\circ} = + 1,42^\circ$ bei $l = 1$ dm; woraus $[\alpha]_{546}^{17^\circ} = + 24,8^\circ$ anstatt $25,32^\circ$ berechnet ist.

Zweiter Silberbarytniederschlag. Es wurden 5,52 g salpetersauren Methylguanidins mit dem Schmelzpunkt 144 bis 146° isoliert.

Aus der Fraktion Wismutjodidniederschlag wurden nur 2,3 g einer Sublimatverbindung von Carnitin mit dem Schmelzpunkt 196—197° erhalten.

III. Portion. (Übliche Methode.)

Zu dieser Portion wurde nach vorangegangener Behandlung mit neutralem Bleiacetat vor der Fällung mit Phosphorwolframsäure bis 5% Schwefelsäure zugesetzt.

Silberniederschlag. 0,48 g Purine.

Aus dem ersten Silberbarytniederschlag wurden 6,0 g Carnosin mit dem Zersetzungspunkt 230° auskrystallisiert. Gereinigt wurde diese Fraktion zusammen mit der entsprechenden aus Portion IV.

Zweiter Silberbarytniederschlag. 5,51 g salpetersauren Methylguanidins mit dem Schmelzpunkt 149—150°.

Aus der Fraktion des Wismutjodidniederschlags wurden 5,3 g der Sublimatverbindung des Carnitins isoliert, deren Schmelzpunkt sich = 203—204° erwies.

IV. Portion.

Die vierte Portion wurde direkt mit 40%iger Phosphorwolframsäure ohne irgend welche vorhergehende Behandlung und ohne Schwefelsäurezusatz gefällt.

Silberniederschlag. Auf die übliche Weise wurde das Vorhandensein von 0,54 g freier Purinkörper dargetan.

Erster Silberbarytniederschlag. Die Krystallisation gab 13,2 g Carnosin, die bei 230° sich zersetzten. Diese Fraktion wurde mit der ihr entsprechenden Fraktion aus Portion III vermennt und zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens mehrmals umkrystallisiert. Die Zersetzungstemperatur stieg dabei auf 240—241°.

IV. 0,9490 g der Substanz wurden in Wasser zu 16,8684 g gelöst; $p = 5,626\%$ (nach dem Filtrieren 5,629%); $c = 5,730\%$; $\alpha_{546}^{17^\circ} = +2,82^\circ$ bei $l = 2$ dm; woraus $[\alpha]_{546}^{17^\circ} = +24,6^\circ$ anstatt 25,32° erhalten wurde.

Aus derselben Fraktion wurde ein Teil zur N-Bestimmung genommen.

V. 0,0946 g Substanz gaben 20,5 ccm N bei 18° und 758 mm Bar.

Gefunden:

V

N = 24,75%.

Berechnet für:

$C_9H_{14}N_4O_3$

24,80%.

Zweiter Silberbarytniederschlag. 4,25 g Methylguanidinnitrat, welches bei 140—142° schmolz. Alle Fraktionen des Methylguanidinnitrats wurden vermennt und behufs Reinigung zweimal unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert. Schmelzpunkt 150°.

Die Bestimmung des Prozentgehalts des Stickstoffs bestätigte, daß die Substanz wirklich Methylguanidinnitrat war.

VI. 0,0850 g Substanz gaben 31,3 ccm Stickstoff bei 19° und 750 mm Bar.

Gefunden

VI

N = 41,40%

Berechnet

für $C_2H_7N_3 \cdot HNO_3$

41,18%

Im Wismutjodidniederschlag wurde 6,8 g einer Sublimatverbindung des Carnitins gefunden, welche bei 203 bis 204° schmolz. Alle Sublimatverbindungen wurden vereinigt und aus heißem Wasser umkrystallisiert. Schmp. 204—205°.¹⁾

VII. 6,2578 g Substanz verloren beim Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure nur 0,0023 g, folglich enthält die Substanz kein Krystallwasser.

VIII. 0,2610 g derselben Substanz gaben 0,1719 g HgS, welches bei 95—100° getrocknet worden war.

IX. Aus dem HgS-Filtrat, welches bei Gegenwart von CaCO₃ abgedampft wurde, wurden 0,2146 g AgCl erhalten.

Gefunden		Berechnet
VIII	IX	für C ₇ H ₁₃ NO ₃ · 2 HgCl ₂
Hg 56,78 %	—	56,90 %
Cl —	20,34 %	20,17 %

Aus dem Filtrate nach der Bestimmung des Hg und des Cl wurde das Goldchlorid der Base erhalten, welches bei 153—154° schmolz.¹⁾

	I.		II.	III.	IV.	Im Mittel
	A	B				
Purine	0,062 %	—	0,011 %	0,011 %	0,012 %	0,024 %
Carnosin	0,318 %	—	0,311 %	0,133 %	0,298 %	0,265 %
Methylguanidin . . .	0,002 %	0,046 %	0,066 %	0,066 %	0,051 %	0,058 %
Carnitin	—	0,037 %	0,012 %	0,027 %	0,035 %	0,029 %
Phosphorwolframsäure	—	700,0 g	1400,0 g	900,0 g	700,0 g	—

Diese Tafel zeigt deutlich, welchen Schwankungen die Ausbeute der ausgeschiedenen Substanzen aus einer absolut gleichen Mischung eines und desselben Extrakts unter dem Einfluß geringer Veränderungen in der Verarbeitungsweise ausgesetzt ist. In Anbetracht der Lästigkeit der Behandlung, die sehr viel Zeit erfordert und aus einer großen Anzahl mannigfaltiger Manipulationen besteht, kann von einer quantitativen Isolierung der Basen natürlich nicht die Rede sein.

Soviel nach den in obiger Tafel zusammengestellten Resultaten vorliegender Untersuchung sich beurteilen läßt, gibt den besten Ertrag an Purinen und Carnosin die Fällung

¹⁾ R. Krimberg, Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 475 (1908).

mit Quecksilbersulfat; die Fällung mit Phosphorwolframsäure unter Schwefelsäurezusatz setzt die Carnosinmenge bedeutend herab, und der Zusatz von Bleisalzen verschlechtert den Ertrag an Carnitin, befördert aber sehr wenig den des Methylguanidins.

Die vorläufige Behandlung des Extrakts mit Bleiacetat muß für überflüssig angesehen werden, da die Einführung von essigsäuren Salzen der Fällung der phosphorwolframsäuren Basen hinderlich ist und einen noch größeren Verbrauch der kostbaren Phosphorwolframsäure (1400 g anstatt 700 g) bedingt; dies gilt nicht nur vom Carnosin (um 58% weniger in III), sondern scheint auch vom Carnitin (II und III) zu gelten. In seiner ersten Arbeit mit Extrakten wandte Wl. Gulewitsch die Fällung mit Bleiacetat nicht an.¹⁾

Vergleicht man Portion I mit Portion III (die gewöhnliche in J. Hoppe-Seylers Handbuch d. phys. u. pathol. chem. Anal. angeführte Methode), so findet man für die I. eine Ersparnis von 22% Phosphorwolframsäure, wobei der Ertrag aller Basen (ausgenommen Methylguanidin) in der I. Portion höher war.

Die Einführung von Bleisalzen ohne Schwefelsäurezusatz (II) bedingt einen doppelten Verbrauch an Phosphorwolframsäure, welcher durch Schwefelsäurezusatz bedeutend vermindert wird (III).

Die Behandlung des Extrakts mit Quecksilbersulfat bewirkt wahrscheinlich einen um 5—6mal größeren Ertrag an Purinkörper, als aus dem Phosphorwolframat erhalten wird; es ist jedenfalls festgestellt, daß die Phosphorwolframsäure die Purine nicht vollständig fällt.²⁾ Bleisalze und Schwefelsäure scheinen auf die von Phosphorwolframsäure gefällten Purinmengen keinen Einfluß auszuüben.

Eine derartige vergleichende Untersuchung mittels verschiedener Methoden von Portionen eines und desselben Extrakts, d. h. von Flüssigkeiten absolut identischer Zusammensetzung, ist so viel uns bekannt zum erstenmal ausgeführt worden.

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

²⁾ Burian und Hall, Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 374 (1903).