

Über den Karnosingehalt der Säugetiermuskeln

von

Marie Mauthner.

Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Otto v. Fürth im Physiologischen Institute der Wiener Universität.

(Vorgelegt in der Sitzung am 6. März 1913.)

I. Einleitung.

Unter den Extraktivstoffen des Säugetiermuskels beansprucht das von Gulewitsch im Jahre 1900 entdeckte Karnosin¹ ein besonderes Interesse. Diese mit dem von Kutscher aus dem Fleischextrakt isolierten Ignotin² allem Anscheine nach identische Substanz ist eine Base von der Zusammensetzung $C_9H_{14}N_4O_3$ ³, welche als ein aus Histidin und Alanin zusammengesetztes Dipeptid⁴ gedeutet worden ist. Aus den neuesten Beobachtungen von Gulewitsch ist

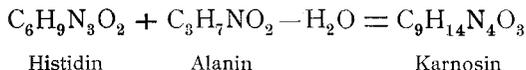
¹ Zeitschrift für physiol. Chemie, 30, 565 (1900). — Ber. der Deutschen chem. Ges., 33, 1902 (1900).

² Zentralblatt für Physiol., 19, 504—508 (1905). — Zeitschrift für Unters. von Nahr.- und Genußmitt., 10, 528—537 (1905). — Gulewitsch, »Über die Identität des Ignotin mit dem Karnosin«. Zeitschrift für physiol. Chemie, 50, 204—208 (1906/07); vergl. ibid. 51, 258—260 (1907); 51, 545 (1907); 52, 527 (1907). — Zeitschrift für Unters. von Nahr.- und Genußmitt., 11, 582.

³ Zentralblatt für Physiol., 19, 504—508 (1905)

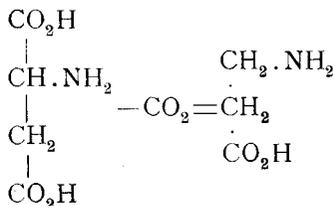
⁴ Gulewitsch, »Über die Bildung des Histidins bei der Spaltung des Karnosin«, Zeitschrift für physiol. Chemie, 50, 535—537 (1906/07).

weiterhin zu entnehmen, daß das Alanin, welches mit dem Histidin nach der Gleichung



zusammentritt, angeblich nicht das typische α -Alanin $\text{CH}_3 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$, vielmehr das β -Alanin $\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ ist¹.

Angesichts des Umstandes, daß im allgemeinen nur α -Aminosäuren beim Aufbau physiologisch bedeutsamer Substanzen beteiligt sind, erscheint das Auftreten des β -Alanins bei der Karnosinspaltung einigermassen überraschend. Dasselbe wird aber verständlicher, wenn man sich vergegenwärtigt, daß das β -Alanin² durch CO_2 -Abspaltung aus der Asparaginsäure hergeleitet werden kann:



Was die Eigenschaften³ des Karnosins betrifft, ist dasselbe eine basische, durch Phosphorwolframsäure und durch viele andere Basenfällungsmittel fällbare Substanz, deren Isolierung auf dem Umstande beruht, daß dieselbe nicht mit AgNO_3 direkt⁴, wohl aber auf weiteren Zusatz von Ba(OH)_2 zur silberhaltigen Lösung ausfällt.

Nach Zerlegung des Silberniederschlags mit H_2S und Neutralisation mit HNO_3 krystallisiert das ziemlich leicht lös-

¹ Gulewitsch: »Über die Konstitution des Karnosins«. Zeitschrift für physiol. Chemie, 73, 434—446, 1911.

² Vergl. O. v. Fürth, Probleme der physiol. und pathol. Chem., 1, 35 (1912).

³ Demjanowski, Zeitschrift für physiol. Chemie, 80, 212 (1912).

⁴ Gulewitsch, Zeitschrift für physiol. Chemie, 30, 569 (1900).

liche Karnosinnitrat¹ in strahligen Nadeln aus. Zum Nachweise des Karnosins kann außer einer Kupferverbindung desselben² eine Farbenreaktion dienen, welche das Karnosin mit Diazobenzolsulfosäure gibt und welche Reaktion der im Moleküle des Karnosins enthaltenen Histidinkomponente zuzuschreiben ist.

Was die physiologische Bedeutung des Karnosins betrifft, steht dasselbe unter den N-haltigen Muskelextraktivstoffen sicherlich im Vordergrund. Bei Untersuchungen, die kürzlich von Otto v. Fürth und Karl Schwarz über die N-Verteilung im Muskelextrakte ausgeführt worden sind, stellte es sich heraus, daß in der Skelettmuskulatur des Pferdes etwa ein Drittel des Extraktiv-N auf Kreatin und Kreatinin und ein Drittel auf die Karnosinfraktion entfällt, während alle anderen Bestandteile zusammengenommen nur das letzte Drittel des Muskelextrakt-N ausmachen. Während man früher gewohnt war, den Purinkörpern den ersten Rang unter den N-hältigen Extraktivstoffen des Muskels einzuräumen, hat es sich herausgestellt, daß dieselben der Menge nach hinter der Karnosinfraktion weit zurückstehen.

100 g feuchten Skelettmuskels enthalten nach Fürth und Schwarz³: 0·105 bis 0·117 g Karnosin-N,

100 g Herzmuskel: 0·086 bis 0·109 g Karnosin-N,

100 g Rindfleisch nach Skworzow⁴: 0·069 bis 0·12 g Karnosin-N,

100 g quergestreifte Skelettmuskulatur nach einem ähnlichen Vorgange von Buglia und Constantino⁵: 0·105 g Karnosin-N,

100 g Herzmuskel: 0·0445 g Karnosin-N.

¹ Gulewitsch und Amiradzibi, »Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln«. Zeitschrift für physiol. Chemie, 30, 565 (1900). — (1911) Biochemische Zeitschrift, 37, 477—481, Yoshimura.

² Gulewitsch und Amiradzibi, l. c. und Ber. der Deutsch. chem. Ges., 33, 1902 (1900).

³ O. v. Fürth und C. Schwarz, Biochemische Zeitschrift, 30, 414 (1911).

⁴ W. Skworzow, Zeitschrift für physiol. Chemie, 68, 26 (1910).

⁵ Buglia und Constantino, »Beiträge zur Muskelchemie«, II. Mitteilung. Zeitschrift für physiol. Chemie (1912), 81, 125.

Angesichts der großen physiologischen Bedeutung, welche zweifellos dem Karnosin zukommt, ergab sich nunmehr die Aufgabe, festzustellen, ob die Karnosinfraktion wirklich ganz oder ihrer Hauptmenge nach aus Karnosin besteht oder ob in derselben neben dem Karnosin noch andere N-hältige Substanzen enthalten sind.

Meine im nachstehenden mitgeteilten Untersuchungen, welche eine Beantwortung dieser Frage und die Ausarbeitung einer exakten Methode der Karnosinbestimmung zum Gegenstande hatten, umfassen:

1. Versuche zur Isolierung der schwerlöslichen Kupferverbindung des Karnosins.

2. Versuche zur Bestimmung des nach Spaltung des Karnosins auftretenden Histidins.

3. Versuche über die Gewinnung, analytische Zusammensetzung und quantitative Bestimmung einer aus der Karnosinfraktion darstellbaren Pikrolonsäureverbindung des Karnosins.

II. Versuche zur Abscheidung einer Kupferverbindung des Karnosins ¹

Da die schön krystallisierende, von Gulewitsch beschriebene Kupferverbindung des Karnosins zunächst günstige Bedingungen für eine quantitative Abscheidung dieses letzteren darzubieten schien, ging ich zunächst daran, festzustellen, ob und in welcher Weise eine solche erzielt werden kann.

»Zur Identifizierung des Karnosins«, sagt Gulewitsch ², »kann die Cu-Verbindung desselben die besten Dienste leisten, da sie sich in sehr charakteristischen Krystallen ausscheidet. Diese tiefblau gefärbten, kaum 1 *mm* Größe erreichenden Krystalle erscheinen unter dem Mikroskope am häufigsten als sechseckige, ganz regelmäßig ausgebildete oder verlängerte Tafeln, die mit blau gefärbten Zystinkrystallen am besten verglichen werden können.«

¹ Gulewitsch und Amiradzibi, l. c.

² Zeitschrift für physiol. Chemie, 30, 572 (1900).

1. Es wurde zunächst aus $\frac{1}{4}$ kg frischen Pferdefleisches eine »Phosphorwolframsäurefraktion« hergestellt, indem der Kochextrakt mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag in üblicher Weise mit Baryt zerlegt wurde. Nach Beseitigung des Barytüberschusses mit CO_2 wurde die Flüssigkeit mit $\text{Cu}(\text{OH})_2$ am Wasserbade digeriert, durch ein Heißwassertrichter filtriert und die blaugrüne Lösung eingedunstet. Es erfolgte eine reichliche Abscheidung der charakteristischen sechsseitigen, in ihrer Krystallform dem Zystin ähnlichen Täfelchen der Karnosinkupferverbindung, welche leicht von der grünen Mutterlauge abgetrennt werden konnten.

2. Bei einem weiteren Versuche wurde ein Extrakt aus 1 kg Pferdefleisch durch dreimaliges Auskochen hergestellt und mit Bleiacetat gefällt. Die kolloidale Fällung erwies sich erst nach Zusatz eines Barytüberschusses als filtrierbar. Nach Beseitigung des letzteren wurde eingeengt und direkt durch Erwärmen mit $\text{Cu}(\text{OH})_2$ die Darstellung einer Karnosin-Cu-Verbindung versucht; doch zeigte die grünblaue Lösung keinerlei Krystallisationstendenz. Es wurde mit H_2O verdünnt, mit HCl angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ zerlegt; nach CO_2 -Behandlung und kurzem Aufkochen mit $\text{Cu}(\text{OH})_2$ wurde heiß filtriert und bei 50° eingedunstet. Nunmehr krystallisierten reichlich schöne, blaue Täfelchen in einer Ausbeute von zirka 1 g aus.

3. 1 kg Pferdefleisch wurde dreimal mit H_2O ausgekocht, der Extrakt mit Bleiacetat gefällt, das Pb durch H_2S und dieser durch einen Luftstrom vertrieben; die Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure gefällt, der auf dem Nutschfilter gesammelte Niederschlag mit phosphorwolframsäurehaltigem H_2O gewaschen, mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ zerlegt, der Barytüberschuß mit CO_2 beseitigt, die Flüssigkeit mit $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Kahlbaum) aufgekocht, eingeengt, der sich abscheidende Niederschlag aus NH_3 umkrystallisiert, wobei 0.58 g der schön krystallisierten Verbindung gewonnen wurden.

4. Um die Identität der blauen Krystalle mit dem Karnosinkupfer sicherzustellen, wurde 1 kg Pferdefleisch dreimal mit H_2O ausgekocht, das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt; der Niederschlag mit Baryt zerlegt, der Barytüberschuß mit CO_2 beseitigt, die Flüssigkeit auf 100 cm^3 eingeengt, mit $\text{Cu}(\text{OH})_2$ aufgekocht, heiß filtriert, mit heißem H_2O nachgewaschen und die blaue Flüssigkeit im Faust'schen Abdampfapparat unter Überleitung eines kräftigen Luftstromes bei 50° eingeengt. Die auskrystallisierende Cu-Verbindung konnte aus NH_3 umkrystallisiert werden. Es resultierten so schöne, blaue, sechsseitige Krystalle, die nach Trocknung im Vacuum folgende Zusammensetzung aufwiesen:

a) 0·458 g Substanz: 0·1224 g CuO, 21·35% Cu.

b) N-Bestimmung nach Kjeldahl: 0·1335 g Substanz, 17·4 cm³ $\frac{1}{10}$ normale H₂SO₄, 0·0244 g N, 18·3% N.

Karnosinkupfer¹ C₉H₁₄N₄O₃·CuO:

	Berechnet	Gefunden
Cu	20·79%	21·35%
N	18·30 »	18·30 «

An der Identität des so gewonnenen, schön krystallisierten Kupfersalzes mit dem Karnosinkupfer kann sonach nicht gezweifelt werden. Die Ausbeute an demselben blieb jedoch stets weit hinter unserer Erwartung zurück und ist die Hoffnung, ein quantitatives Karnosinbestimmungsverfahren auf die Abscheidung der schwerlöslichen Kupferverbindung gründen zu können, durch eine Reihe weiterer Versuche, welche zu negativen Ergebnissen führten, bald zunichte geworden.

5. So gelang es nicht, aus einem nach dem Vorgange von Gulewitsch gewonnenen Präparate von Karnosinnitrat, welches nach Krystallform und qualitativen Reaktionen die Eigenschaften eines solchen darbot, jedoch allerdings einen zu niedrigen N-Gehalt zeigte, ein typisches Kupfersalz darzustellen. Auch resultierte in diesem Falle auffallenderweise nach der Kupferbehandlung keine schöne blaue, sondern eine grüne Lösung, ohne jede Krystallisationstendenz. Ähnlich verhielten sich drei Karnosin-, beziehungsweise Phosphorwolframsäurefraktionen, welche aus einem Pferdeherzen sowie aus je 2, beziehungsweise 3 kg Pferdefleisch dargestellt worden waren. Auch alle Versuche, das Kupfersalz nach entsprechender Fraktionierung aus Liebig'schem Fleischextrakt zu gewinnen, schlugen fehl, trotzdem in allen diesen Fällen die »Karnosinfraktion« sehr große Substanzmengen enthielt. Auch war der Umstand, daß das Lösungsvermögen für CuO dem N-Gehalt der »Karnosinfraktion« so ganz und gar nicht proportional war, viel zu augenfällig, um übersehen werden zu können. Wir konnten

¹ Zeitschrift für physiol. Chemie, 30, 571; 73, 434 (1911).

dieses Verhalten nur so deuten, daß das Karnosin in den aus Fleisch gewonnenen Extrakten und Fraktionen anscheinend in verschiedenen Formen auftreten kann, wobei es naheliegend wäre, etwa an eine Anhydridbildung oder dergleichen zu denken. Eine Aufklärung dieses Verhaltens muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, doch ist es einleuchtend, daß unter diesen Umständen die Darstellung der Cu-Verbindung einstweilen unmöglich eine geeignete Grundlage zur Ausarbeitung eines exakten Bestimmungsverfahrens bieten konnte.

III. Versuche zur quantitativen Bestimmung des aus der Karnosinfraktion abspaltbaren Histidins.

Da das Histidin zweifellos eine der Komponenten, welche das Karnosin zusammensetzen, bildet, lag es nahe, zu versuchen, das durch Karnosinspaltung gewonnene Histidin der quantitativen Bestimmung zuzuführen.

1. Vorversuche.

Es gelingt auch ohne weiteres nach Säurehydrolyse einer Karnosinfraktion, das dabei auftretende Histidin in Form des schwer löslichen, schön krystallisierenden Histidinmonopikrolonates zur Abscheidung zu bringen. So wurde aus einigen Gramm eines nach Gulewitsch dargestellten, jedoch nicht ganz reinen Präparates von krystallisiertem Karnosinnitrat (siehe oben) das Karnosin durch Silberbarytfällung neuerlich abgeschieden, der Niederschlag abgetrennt und ausgewaschen, durch dreistündiges Kochen mit $\frac{1}{2}$ l konzentrierter HCl hydrolysiert, filtriert, das Filtrat durch Eindampfen von HCl befreit, der Rückstand in H₂O gelöst, mit Phosphorwolframsäure gefällt und aus dem Filtrate nach dem von Kossel und seinen Mitarbeitern angegebenen Verfahren¹ (siehe Abderhalden, Handlexikon, Bd. IV, p. 716 [1911]) das Histidinmonopikrolonat²) zur Abscheidung gebracht.

Nach einem ähnlichen Verfahren gelang es, aus einer Karnosinfraktion aus Pferdeherz, die 100 g Muskel entsprach, das krystallisierte Histidinmonopikrolonat nach der HCl-Hydrolyse zu isolieren und durch die schöne Diazoreaktion, welche, ebenso wie mit dem Histidin, auch der Pikrolonsäureverbindung derselben eigentümlich ist, zu identifizieren.

¹ Abderhalden, Handlexikon, IV, 729 (1911).

² Steudel, »Das Verhalten der Hexonbasen zur Pikrolonsäure«. Zeitschrift für physiol. Chemie, 44, 157 (1905).

Bei einem weiteren Versuche wurde aus 3 kg Pferdefleisch die Karnosinfraktion, jedoch ohne Einhaltung quantitativer Kautelen, hergestellt und einer fünfstündigen Hydrolyse mit 25% H_2SO_4 unterworfen. Die Lösung wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, der abgetrennte Niederschlag in H_2O suspendiert und durch Zusatz von Aceton gelöst.

Die Löslichkeit des Histidinphosphorwolframates in Aceton ist von E. Wechsler im Laboratorium Kossel's festgestellt worden¹. Die Acetonlösung wurde mit Barytwasser, dem Vorgange des Kossel'schen Laboratoriums entsprechend, gefällt, das Filtrat durch CO_2 von Ba befreit und abgedampft; der Rückstand mit wenig H_2O aufgenommen und daraus Histidinpikrolonat in einer Ausbeute von 4·5 g gewonnen.

2. Bestimmung des aus Liebig'schem Fleischextrakt absaltbaren Histidins.

100 g Liebig's Fleischextrakt wurden in H_2O gelöst und mit 20% Bleiacetatlösung ausgefällt. Die Flüssigkeit wurde mit H_2S entbleit, auf $\frac{1}{4}$ l eingengt, dann mit soviel H_2SO_4 versetzt, daß die Konzentration 25% betrug und nun sechs Stunden lang unter Rückflußkühlung gekocht. Sodann wurde die H_2SO_4 durch Zusatz von gepulvertem Ätzbaryt und von Barytwasser bis zur schwach sauren Reaktion beseitigt, durch Abdampfen mit MgO von NH_3 befreit, mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ alkalisch gemacht, mit CO_2 gesättigt, auf 300 cm^3 eingengt und mit HNO_3 schwach angesäuert; nunmehr wurde die Ausfällung des Histidins mit AgNO_3 und $\text{Ba}(\text{OH})_2$ nach Kossel's Vorschriften vorgenommen, der Silberhistidinniederschlag mit H_2S zerlegt, mit siedendem H_2O vollständig erschöpft, die Flüssigkeit mit einem Überschusse von Baryt versetzt und dieser mit CO_2 beseitigt, das Filtrat auf 500 cm^3 aufgefüllt. Die N-Bestimmung in einem aliquoten Teile der Flüssigkeit ergab für die Gesamtheit derselben einen Gehalt von 1·075 g Histidin-N, was 1·433 g Karnosin-N entspricht. Bringt man für 100 g Fleischextrakt einen Gesamt-N-Gehalt von 8·58% in Rechnung², so ergibt sich, daß von demselben 16·7% auf Karnosin entfallen. Nach den Bestimmungen von Otto v. Fürth und Karl Schwarz entfällt dagegen vom Extrakt-N frisch bereiteten Fleischextraktes 30 bis 36% auf den Karnosin-N, also wesentlich mehr; doch wird man zu berücksichtigen haben, daß beim Aufarbeiten von kleinen Fleischmengen, wie dies bei den quantitativen Bestimmungen von Fürth und Schwarz der Fall war, Verluste weit eher vermieden werden können als bei der Verarbeitung einer so großen Quantität, wie es immerhin 100 g Fleischextrakt darstellt. Meine Ausbeute kann daher in diesem Falle nur als Minimalwert gedeutet werden.

¹ E. Wechsler, Phys. Inst., Heidelberg: »Zur Technik der PWS-Fällung«. Zeitschrift für physiol. Chemie, 23, 138 (1911).

² König, Chemie der Nahrungs- und Genußmittel, II. Auflage (1903), 23.

3. Histidinbestimmung in Karnosinfraktionen aus frischem Pferdefleisch.

Auf Grund der in den im Vorstehenden mitgeteilten Versuchen gesammelten Erfahrungen gingen wir nun daran, in möglichst exakter Weise festzustellen, ein wie großer Bruchteil der nach dem Verfahren von Otto v. Fürth und Karl Schwarz aus frischem Pferdefleische gewonnenen Karnosinfraktion tatsächlich auf Karnosin als solches und wieviel auf beigemengte Substanzen entfällt.

Darstellung der Karnosinfraktion.

Es wurde zu diesem Zwecke aus je 3 kg frischen Pferdefleisches die Karnosinfraktion in der Weise dargestellt, daß der Kochextrakt unter Anwendung der von Gulewitsch und Krimberg, beziehungsweise Kutscher empfohlenen Prinzipien von den durch Bleiacetat und AgNO_3 bei saurer Reaktion fällbaren Substanzen befreit wurde. Zum Filtrate wurden weitere Mengen AgNO_3 hinzugefügt, bis eine Probe der Flüssigkeit mit Ba(OH)_2 gemischt durch Auftreten einer dunklen Fällung das Vorhandensein eines Silberüberschusses verriet. Schließlich wurde durch Zusatz eines Überschusses von Ba(OH)_2 das Karnosin ausgefällt, der Karnosinsilberniederschlag mit H_2S zerlegt, die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht und mit einem aliquoten Teil derselben der N-Gehalt nach Kjeldahl ermittelt. In einem Falle, wo alle die zahlreichen Prozeduren mit möglichster Vermeidung von Verlusten durchgeführt und insbesondere auch die Silberbarytfällung in möglichst erschöpfender Weise mit H_2S zersetzt worden war (der Ag_2S -Niederschlag wurde viermal mit H_2O verrieben und immer wieder mit H_2S behandelt), gelang es, eine Karnosinfraktion zu gewinnen, deren N-Gehalt je 1 kg frischen Muskelfleisches entsprechend 0·949 g N betrug, welcher Wert den Ausbeuten von Fürth und Schwarz (1·05 bis 1·17 g N für 1 kg Muskel) nahekommt.

a) HCl-Spaltung der Karnosinfraktion: $\frac{1}{2}$ l einer Karnosinfraktion, 0·1668 g N enthaltend, wurde mit $\frac{1}{2}$ l rauchender HCl drei Stunden lang unter Rückflußkühlung gekocht,

sodann in einer Schale am Wasserbade zur Trockene gedampft. Der Rückstand wurde in heißem Barytwasser gelöst, der Barytüberschuß mit CO_2 beseitigt, das Filtrat stark eingeeengt und mit der (der theoretisch möglichen Maximalausbeute an Histidin entsprechenden) Pikrolonsäuremenge versetzt. Beim Einengen am Wasserbade fiel ein gelber Niederschlag aus, der aus $\frac{1}{2}$ l siedendem H_2O umkrystallisiert wurde. Beim Erkalten schied sich das Pikrolonat krystallinisch ab; dasselbe wurde auf einem gewogenen Filter gesammelt, das Filtrat auf ein geringes Volumen eingeeengt, die beim Erkalten erfolgende Krystallisation mit der ersten vereinigt und gewogen. Die gefundene Ausbeute an Monopikrolonat betrug

1·119 g, also

89·74 % der theoretisch berechneten

Ausbeute (1·247 g).

b) Ein weiterer Versuch, analog dem früheren, jedoch mit einer erheblich N-reicheren Karnosinfraktion (0·949 N), entsprechend 1 kg Fleisch, ergab eine Ausbeute von 4·954 g Histidinmonopikrolonat, was 0·662 g Karnosin-N entspricht (berechnet nach der Relation: $x:4\cdot954 = \text{Karnosin-N}(56):\text{Monopikrolonat}(419)$). Dies kommt 69·77% der theoretischen Ausbeute gleich.

c) H_2SO_4 -Spaltung der Karnosinfraktion. In einem Parallelversuche wurde $\frac{1}{2}$ l einer Karnosinfraktion (0·1668 g N enthaltend) mit der Abweichung verarbeitet, daß die Spaltung, statt mit HCl, mit H_2SO_4 vorgenommen wurde.

Zu diesem Zwecke wurde die Flüssigkeit mit 150 g konzentrierter H_2SO_4 versetzt und das Volumen auf 600 cm^3 ergänzt. Nun wurde fünf Stunden lang unter Rückflußkühlung am Sandbade gekocht, die H_2SO_4 mit gepulvertem Ätzbaryt und schließlich der Rest mit Barytwasser, der Barytüberschuß mit CO_2 beseitigt. Der voluminöse Niederschlag wurde sorgfältig mit heißem Wasser ausgelaugt und aus der stark eingeeengten Flüssigkeit das Pikrolonat wie oben abgeschieden. Das Gewicht der gelben Krystallmasse, die sich bei mikroskopischer Untersuchung als durchaus homogen erwies, betrug in diesem Falle 1·033 g Monopikrolonat, was 82·85 % der theoretischen Ausbeute (1·248 g) entspricht.

Der Vergleich mit einem aus käuflichem Histidinhydrochlorid (Schuchardt) dargestellten Histidin pikrolonate ergab eine vollkommene Übereinstimmung mit dem aus frischem Pferdefleisch wie aus Liebig's Extrakt gewonnenen Präparat. (Überdies haben wir noch einen Kontrollversuch durchgeführt, bei dem die verwendete Pikrolonsäuremenge in Alkohol gelöst, zu siedendem Wasser zugesetzt und die Lösung eingeengt wurde; bei welchem Versuche wir uns überzeugen konnten, daß unter den Konzentrationsverhältnissen und den Bedingungen, welche bei unseren Versuchen praktisch in Betracht kommen, eine Beimengung von kristallisierter Pikrolonsäure zum Histidin pikrolonat nicht zu befürchten ist.)

Aus den mitgeteilten Versuchen ist zu ersehen, daß die Karnosinfraktionen tatsächlich allem Anscheine nach in ihrer Hauptmenge aus Karnosin oder einer demselben nahestehenden Substanz bestanden, insoferne es nach Hydrolyse derselben gelungen ist, vier Fünftel und mehr der theoretischen Histidinausbeute nach dem besten bisher zur Verfügung stehenden Histidinbestimmungsverfahren, nämlich dem Pikrolonsäureverfahren Kossel's, daraus zu gewinnen.

IV. Gewinnung eines Karnosin pikrolonates.

Darstellung einer pikrolonsauren Verbindung des Karnosins.

Der Umstand, daß die Pikrolonsäure¹ befähigt ist, sich mit vielen Substanzen basischer Natur zu schwerlöslichen Verbindungen zu vereinigen, legte es nahe, zu versuchen, ob es nicht etwa gelingt, das Karnosin direkt aus der »Karnosinfraktion« mit Hilfe dieses Reagens in schwerlöslicher Form abzuscheiden und einer quantitativen Bestimmung zugänglich zu machen.

a) Eine Karnosinfraktion, 1·479 g N enthaltend (dies entspricht 5·9 g Karnosin), war in der oben besprochenen Weise dargestellt worden; nun wurde soviel Pikrolonsäure, als die Bildung eines Monopikrolonates erforderte, id est zirka 7 g, in alkoholischer Lösung zugesetzt. Beim Einengen der Flüssigkeit schied sich eine gelbe Krystallmasse ab. Der Zersetzungspunkt der Krystalle betrug 202 bis 207°, nach Umkrystallisieren 209°. Die Anwesenheit des Karnosins, beziehungsweise des Histidinkomplexes in der Verbindung verrät sich durch die schöne Diazo reaktion mit Diazobenzosulfosäure, welche dieselbe unter den von Pauli beschriebenen Modalitäten in ähnlicher Weise wie

¹ Stendel, »Das Verhalten der Hexonbasen zur Pikrolonsäure«. Zeitschrift für physiol. Chemie, 37, 219 (1902/3).

das Histidin gibt¹. Nach Abtrennung der Krystallmasse schieden sich aus der Mutterlauge auf weiteren Pikrolonsäurezusatz noch Krystalle ab. Die vereinigten Krystallisationen, aus H₂O umkrystallisiert und im Vakuum getrocknet, ergaben eine Ausbeute von 9·73 g.

Die theoretische Ausbeute an Karnosinmonopikrolonat hätte unter der Voraussetzung, daß aller in der Karnosinfraktion enthaltene N wirklich Karnosin gewesen wäre, 12·8 g betragen müssen.

b) Ein analoger Versuch wurde mit einer Karnosinfraktion mit einem N-Gehalt von 0·5685, entsprechend 2·27 g Karnosin, angestellt.

Die Bildung eines Monopikrolonates würde die Addition von 2·7 g Pikrolonsäure erfordern. Dieses Quantum wurde in Alkohol gelöst und zu der 300 cm³ betragenden Flüssigkeit gegeben; die sich beim Einengen abscheidende Krystallmasse wurde abgetrennt, die Mutterlauge mit einem weiteren Gramm Pikrolonsäure versetzt und eingeengt. Die Ausbeute betrug in diesem Falle 4 g.

c) Da wir auf Grund der weiter unten mitgeteilten Analysen zu der Annahme berechtigt waren, daß sich das Karnosin aus seiner Lösung jedoch nicht in Form eines Monopikrolonates, sondern als Natriumsalz eines Karnosindipikrolonates abscheidet, haben wir in weiteren Versuchen, um eine quantitative Karnosinfällung zu erzielen, den Pikrolonsäurezusatz je einem Karnosinmoleküle entsprechend mit zwei Molekülen Pikrolonsäure bemessen.

Eine Karnosinfraktion, 0·0947 g N enthaltend (entspricht 0·38 g Karnosin), wurde portionenweise mit 0·95 g Pikrolonsäure versetzt. (Ein Dipikrolonat würde einen Zusatz von 0·89 g Pikrolonsäure erfordern.) Das Gewicht der Krystallabscheidung betrug in diesem Falle 1·069 der Pikrolonsäureverbindung, was als Mononatriumkarnosindipikrolonat gerechnet eine Ausbeute von 81·3 %₀ bedeutet (0·0771 g Karnosin-N).

Um uns jedoch die Gewißheit zu verschaffen, daß tatsächlich die Hauptmenge des Karnosins in diesem Falle durch die Pikrolonsäure zur Abscheidung gelangt war, wurde die letzte Mutterlauge mit HCl angesäuert und solange mit Äther ausgeschüttelt, als der Äther noch gefärbte Substanz aufnahm. Da die Pikrolonsäure im Äther leicht löslich, die basischen Substanzen der Karnosinfraktion jedoch durchwegs in salz-

¹ H. Pauli, Zeitschrift für physiol. Chemie, 42, 516 (1904).

saurem Äther unlöslich sind, konnte eine Trennung derselben von der Pikrolonsäure erzielt werden.

Eine N-Bestimmung ergab, daß nach Beseitigung der Pikrolonsäure noch $0\cdot0198\text{ g N}$ im Filtrate enthalten war, was $20\cdot8\%$ des N der Karnosinfraktion entspricht. Die Summe der beiden N-Fractionen, in welche die Karnosinfraktion durch das Pikrolonsäureverfahren aufgeteilt worden war, beträgt sonach:

$$\begin{array}{r} \text{durch Pikrolonsäure fällbarer Karnosin-N.} \quad 0\cdot0771\text{ g} = 81\cdot3\% \\ \text{» » nicht fällbarer N-Rest.} \quad 0\cdot0198\text{ g} = 20\cdot8\% \\ \hline \phantom{\text{durch Pikrolonsäure fällbarer Karnosin-N.}} \quad 0\cdot0969\text{ g} = 102\cdot1\% \\ \text{Ursprüngliches Ausgangsmaterial N} \quad \dots 0\cdot0947\text{ g} \end{array}$$

Die Übereinstimmung ist also eine sehr befriedigende und es ergibt sich im Einklang mit der quantitativen Bestimmung des aus den Karnosinfraktionen durch Hydrolyse abspaltbaren Histidins, daß etwa vier Fünftel des in der Karnosinfraktion enthaltenen N auf Karnosin als solches oder eine demselben nahestehende Substanz bezogen werden dürfen.

d) Eine Karnosinfraktion, enthaltend $0\cdot36\text{ g N}$, wurde mit $4\cdot59\text{ g}$ Pikrolonsäure in alkoholischer Lösung versetzt und die Krystallmasse durch einmaliges Umkrystallisieren von auf dem Filter zurückbleibendem, schwerlöslichem Baryumpikrolonat befreit.

Die Ausbeute betrug nach dem Umkrystallisieren $4\cdot505\text{ g}$.

Es entspricht dies einem Gehalte an Karnosin-N = $0\cdot325\text{ g} = 90\cdot36\%$.

In der Mutterlauge fand sich nach Beseitigung der Pikrolonsäure durch Ausschütteln mit Äther nach Säurezusatz noch $0\cdot0355\text{ g N}$, was $9\cdot8\%$ des Gesamt-N der Karnosinfraktion entspricht.

$$\begin{array}{r} \text{Die Ausbeute an Karnosin-N} \quad \dots 0\cdot325\text{ g} = 90\cdot36\% \\ \text{» » » Rest-N} \quad \dots \quad 0\cdot036\text{ g} = 9\cdot80\% \\ \hline \phantom{\text{Die Ausbeute an Karnosin-N}} \quad 0\cdot361\text{ g} = 100\cdot16\% \end{array}$$

Ursprüngliches Ausgangsmaterial $0\cdot360\text{ g} = 100\%$

Die Ausbeute ist also auch in diesem Falle eine quantitative. Ich bemerke noch, daß die Diazoreaktion uns darüber

vergewissert hat, daß nach Abtrennung des durch Pikrolonsäure fällbaren Karnosins in den Mutterlaugen keine oder höchstens minimale Spuren einer mit dem Diazoreagens sich färbenden Substanz vorhanden waren.

V. Analyse der Karnosinpikrolonsäureverbindung.

Das bei den oben angeführten Versuchen und auch aus anderen Karnosinfraktionen erhaltene Material wurde dazu benützt, um die analytische Zusammensetzung der Karnosinpikrolonsäureverbindung festzustellen.

Ich bringe in Erinnerung, daß die Darstellung der »Karnosinfraktionen« in der Art erfolgte, daß der Kochextrakt aus frischen Pferdemuskeln, nach Beseitigung der mit neutralem Bleiacetat sowie mit AgNO_3 bei saurer Reaktion fällbaren Substanzen, mit AgNO_3 unter Barytzusatz ausgefällt und der Niederschlag mit H_2S zerlegt wurde. Da die Karnosinfraktionen sich vielfach barythältig erwiesen, die Karnosinpikrolonsäureverbindung jedoch als Natriumsalz zur Abscheidung gelangen sollte, empfiehlt es sich unter allen Umständen, das Baryt durch einen kleinen Überschuß von H_2SO_4 aus der Karnosinfraktion zu entfernen und sodann die Flüssigkeit mit Natronlauge zu neutralisieren. Nachdem in einem aliquoten Teile der Flüssigkeit der N-Gehalt ermittelt worden ist, wird die derart berechnete Pikrolonsäuremenge, daß zu je einem Molekül Karnosin zwei Moleküle Pikrolonsäure hinzugefügt werden, in Alkohol gelöst, zur heißen Lösung hinzugefügt, worauf je nach Konzentrationsverhältnissen sich eine Trübung bildet oder ein Niederschlag ausfällt. Durch Einengen am Wasserbad wird eine vollständige Abscheidung der schwer löslichen Verbindung erzielt. Die Krystallmasse wird durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser, wobei harzige Massen ungelöst bleiben, gereinigt und das Umkrystallisieren in gleicher Weise noch zweimal wiederholt. Man erhält so die Verbindung in Form intensiv gelb gefärbter, aus spießigen, sehr kleinen, mikroskopischen Krystallen zusammengesetzte Krystalldrusen, welche bei mikroskopischer Untersuchung durchaus einheitlichen Charakter zeigen. Es gelangten zwei gesondert dargestellte Präparate zur Analyse.

Verbrennungen.

Da das Präparat zum Verpuffen neigt, mußten die Verbrennungen sehr langsam und vorsichtig geleitet werden.

Bei der CO_2 -Bestimmung mußte der vom Natrium in der Gestalt von Na_2CO_3 gebundene C berücksichtigt werden¹.

Präparat I, enthält 3·48% Na.

a).....0·1878 g S 0·295 g CO_2 0·0625 g H_2O

43·76% C 3·7% H

b).....0·1810 g S 0·2871 g CO_2 0·0769 g H_2O

44·17% C 4·72% H

c).....0·2056 g S 0·3218 g CO_2

43·52% C

d) N-Bestimmung nach Dumas:

0·2885 g S 56·3 cm^3 N

751·0 mm über Kalilauge gem.

741·0 mm entsprechend22·09% N

(18·5°)

e) Na-Bestimmung als Na_2CO_3 :

0·1666 g S 0·0136 g Na_2CO_3

3·54% Na

f) als Na_2SO_4 :

0·1100 g S gab nach Veraschung und Abrauchen der Asche mit H_2SO_4 in der Muffel

0·0131 g Na_2SO_4

3·86% Na

g) als Na_2SO_4 .

Die Substanz wurde erst mit $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, dann mit einigen Tropfen HNO_3 , schließlich mit H_2SO_4 in der Muffel abgeraucht.

0·2292 g S 0·0216 g Na_2SO_4

3·05% Na

Präparat II, theoretisch berechneter Na-Gehalt 2·96%.

a).....0·2986 g S 0·4783 g CO_2 0·0988 g H_2O

44·46% C 3·68% H

b).....0·1372 g S 0·04948 g H_2O

4·00% H.

¹ Hans Meyer, Analyse und Konst. org. Verb., II. Auflage, 283.

Übersicht:

	Präparat I			Präparat II		Mittel	Berechnet für Mononatriumkarnosindipikrolonat $C_{29}H_{29}N_{12}O_{13}Na$ Theorie
C	43·76	44·17	43·52	44·46		43·95	44·84
H	3·70	4·72		3·68	4·00	4·02	3·73
N	22·09					22·09	21·65
Na	3·54	3·86	3·05			3·48	2·96
C	26·69					26·46	26·82
						100·00	100·00

Spaltung des Karnosinpicrolonates.

Da die Analysenzahlen eines Karnosinmono- und Dipikrolonates ziemlich nahe aneinander liegen, mußten wir, um die volle Überzeugung zu gewinnen, daß sich wirklich je zwei Moleküle Pikrolonsäure an je einem Molekül Karnosin angelagert hatten, den Nachweis erbringen, daß tatsächlich die entsprechende Menge Pikrolonsäure in unserer Verbindung enthalten war. Der Beweis konnte in der Weise erbracht werden, daß wir das Karnosinpicrolonat durch konzentrierten HCl zur Aufspaltung brachten und die frei gewordene Pikrolonsäure nach Ausschüttelung mit Äther zur Wägung brachten.

a) 1·1967 g viermal aus heißem H_2O umkrystallisierten Karnosinpicrolonates wurden in 700 cm^3 siedendem H_2O gelöst, die Lösung mit HCl angesäuert und nach dem Erkalten so oftmals mit Äther ausgeschüttelt, als derselbe noch in nachweisbarer Menge Substanz aufnahm. Der nach Eindunsten des Äthers zurückbleibende, aus kleinen, hellgelben Krystallen bestehende Rückstand, der keine Spur von Diazoreaktion gab, betrug seinem Gewichte nach $0·8394\text{ g}$, was $70·1\%$ des Ausgangsmaterials entspricht. Das Mononatriumsalz des Karnosindipikrolonates erforderte eine theoretische Ausbeute von 68% Pikrolonsäure. Die von der Pikrolonsäure befreite wässrige

Lösung, welche eine sehr intensive Diazoreaktion gab, enthielt im ganzen 0·0637 g N, was auf Karnosinnatrium umgerechnet 0·2821 g dieses letzteren entspricht.

Die Summe der beiden so getrennten Komponenten beträgt:

Karnosinnatrium	0·2821 g
Pikrolonsäure	... 0·8394 g

Summe 1·1215 g
gegenüber 1·1967 g des Ausgangsmaterials.

b) Ein anderes Präparat von Karnosin-pikrolonat wurde viermal umkrystallisiert, wobei wir neuerdings feststellten, daß der Aschegehalt desselben durch die Prozedur des Umkrystallisierens nicht herabgemindert werden kann. 0·3672 g der Substanz wurden in 20% HCl gelöst und die Lösung im rotierenden Lind'schen Extraktionsapparate, der einen Wirbel feinsten Äthertropfen durch die Flüssigkeit treibt, einige Stunden lang in Äther extrahiert. Das Gewicht des Ätherextraktes betrug in diesem Falle 0·2486 g = 67·7%, was mit dem theoretisch berechneten Pikrolonsäuregehalt eines Mononatriumsalzes des Karnosindipikrolonates (68%) übereinstimmt.

Im Wasserextrakte fanden sich in diesem Falle 0·019 g N, was 0·0841 g Karnosin-Na entspricht.

Die Summe der Komponenten, in welche das Karnosindipikrolonat aufgelöst worden war, betrug in diesem Falle

Karnosinnatrium 0·0841 g
Pikrolonsäure 0·2486 g

	0·3327 g gegenüber
	0·3672 g Ausgangsmaterial.

Aus der Gesamtheit unserer analytischen Befunde ergibt es sich, daß sich tatsächlich je ein Molekül Karnosin oder einer ihm nahestehenden Verbindung mit zwei Molekülen Pikrolonsäure zu der schwerlöslichen krystallisierten Verbindung vereinigt hatten.

Zusammenfassung.

1. Wird aus Fleischextrakt nach Beseitigung der durch Bleiacetat und Silbernitrat fällbaren Substanzen durch Silberbarytfällung und Zerlegung des Niederschlages mit Schwefelwasserstoff eine Karnosinfraktion dargestellt, so gelingt es vielfach, daraus das Karnosin in Form der von Gulewitsch beschriebenen, in blauen, sechsseitigen, zystinähnlichen Täfelchen krystallisierenden, schwerlöslichen Kupferverbindung abzuscheiden. Doch ist es niemals gelungen, eine auch nur annähernd quantitative Ausbeute zu erzielen und deuten zahlreiche unserer Beobachtungen darauf hin, daß neben dem typischen Karnosin nach Gulewitsch in aus Muskeln dargestellten Fraktionen vielfach eine Modifikation, beziehungsweise ein Umwandlungsprodukt des Karnosins enthalten sein dürfte, dem die Eigenschaft, Kupferoxyd zu lösen, abgeht.

2. Die quantitative Bestimmung des nach Säurehydrolyse aus Karnosinfraktionen abspaltbaren Histidins nach dem Kossel'schen Pikrolonsäureverfahren ergab, daß acht Zehntel bis neun Zehntel des in Karnosinfraktionen enthaltenen N in Form von Karnosin oder einer demselben sehr nahestehenden Verbindung enthalten sein dürften.

3. Zu demselben Resultate führte die Abscheidung der Base aus den Karnosinfraktionen in Form eines schwerlöslichen, in mikroskopischen, gelben Nadelaggregaten krystallisierenden Pikrolonates, welches auf Grund der Elementaranalyse sowie der quantitativen Bestimmung der daraus nach HCl-Spaltung abtrennbaren Pikrolonsäure sich mit der Mononatriumverbindung eines Karnosindipikrolonates annähernd übereinstimmend erwies.
