XXV.

Ueber das Vorkommen von Harnstoff im Muskel der Säugethiere.

Von

M. Nencki und A. Kowarski.

Die Angaben über das Vorkommen des Harnstoffes im Muskel der Säugethiere sind seit vielen Jahren wie die Nachrichten über die Seeschlange. Im Jahre 1878 bestimmte Picard¹⁾ die Menge Stickstoff, welche aus den Organextracten durch NaOBr entwickelt werden und berechnet aus dem gefundenen Stickstoff den Harnstoffgehalt. Danach findet er, dass Muskel den grössten Harnstoffgehalt hat. Die Angabe Demant's²⁾, welcher Harnstoff als salpetersauren Harnstoff aus Pferdefleisch dargestellt haben wollte, sowie die andern positiven Angaben, hat sein Lehrer Hoppe-Seyler³⁾ später dementirt. Im Jahre 1884 bestimmte Haycraft⁴⁾ den Harnstoffgehalt im Muskel bei Ruhe und Arbeit, nachdem er sich überzeugete, dass Harnstoff im Muskel vorhanden ist; im Jahre 1889 finden Gréhaut und Quinquaud⁵⁾ in 100 g Muskel 37,8 resp. 107,3 mg Harnstoff, wiederum aus dem entwickelten Stickstoff in dem Fleischauszuge berechnet.

Anlässlich der Untersuchung über die Harnstoffbildung bei den Säugethieren, wollten wir uns in dieser Frage Gewissheit verschaffen und haben in einem Versuche 2,5 Kilo frische Hundemuskel nach dem Verfahren von v. Schröder auf Harnstoff verarbeitet, ohne eine Spur Harnstoff isoliren zu können. In einem zweiten Versuche wurde der wässrige Auszug von einem Kilo Hundemuskel mit Phosphorwolframsäure und Salzsäure vollkommen ausgefällt. Nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit pulverigem Kalk wurde das alkalische Filtrat auf ein Liter gebracht

1) Maly's Jahresbericht. Bd. VIII. S. 262.

2) Ebenda. Bd. X. S. 351.

3) Dessen Lehrbuch der physiologischen Chemie. S. 644.

4) Maly's Jahresbericht. 1884. S. 540.

5) Compt. rend. T. CVIII. p. 1092.

und davon in 2 Proben je 50 resp. 100 g der Lösung mit 10 g krystallisirter Phosphorsäure eingedampft, sodann 3 Stunden auf 240—270° erhitzt und durch Destillation mit Natronlauge das entstandene Ammoniak bestimmt. Wir erhielten für 100 ccm der Lösung 72,6 resp. 73 mg Ammoniak. Die restirenden 850 ccm der Lösung wurden mit oxalsaurem Ammoniak genau ausgefällt, von Kalkoxalat filtrirt, zur Trockne auf dem Wasserbade verdunstet und wiederholt mit absolutem Alkohol ausgezogen. Der alkoholische Auszug, zur Trockne verdunstet, wurde von Neuem mit absolutem Alkohol und etwas Aether in der Kälte aufgenommen, von ungelöstem Salmiak filtrirt und von neuem verdunstet. Aus dem syrupigen Rückstande, der die Kreatininreactionen gab, suchten wir nach dem von Lüd y⁶⁾ ausgearbeiteten Verfahren, Harnstoff nachzuweisen. Das Verfahren beruht auf dem Principe, dass eine alkoholische Harnstofflösung mit alkoholischer Lösung von ortho-Nitrobenzaldehyd, auf dem Wasserbade verdunstet, in

verwandelt wird. Das ortho-Nitrobenzylidendiureid ist ein weisslicher, krystallinischer Körper, der bei 200° schmilzt, in Wasser und Alkohol sehr wenig löslich ist und durch Erwärmen mit verdünnten Mineralsäuren leicht in Harnstoff und ortho-Nitrobenzaldehyd zerfällt. Der letztere Körper, in alkoholischer Lösung, mit Phenylhydrazin versetzt, färbt sich sofort schön roth, indem er das in scharlachrothen, prismatischen Nadeln krystallisirende Hydrazon $= \text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)\text{CH} : \text{N} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$ giebt. Zum Nachweis des Harnstoffs wird der alkoholische Auszug des syrupartigen Verdampfungsrückstandes, aus der eventuell Harnstoff enthaltenden Flüssigkeit mit einer alkoholischen Lösung von ortho-Nitrobenzaldehyd versetzt. Nitrobenzaldehyd muss in solcher Quantität vorhanden sein, dass aller Harnstoff, der muthmaasslich angenommen werden darf, in Reaction treten kann. Die alkoholische Lösung wird auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, hernach mit Alkohol übergossen, kurze Zeit erwärmt und der Alkohol abgegossen. Dies wird 2—3 mal wiederholt, d. h. so lange, bis alle in Alkohol löslichen Stoffe wieder entfernt sind und der Alkohol mit Phenylhydrazinlösung keine Farbenreaction mehr zeigt, also auch überschüssig zugesetztes Nitrobenzaldehyd verschwunden ist. War Harnstoff vorhanden, so hinterbleibt das Condensationsproduct — Nitrobenzylidendiureid — als gelbweisser, pulveriger Körper, der sehr

1) Wiener Akademie-Berichte. Mathem.-naturw. Classe. Bd. XCVIII und Wiener Monatshefte f. Chemie. 1889.

intensiv an den Wänden der Porzellanschale haftet und infolge dessen auch bei minimalen Mengen sehr leicht wahrgenommen werden kann. Nunmehr wird der Rückstand mit wenig verdünnter Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin übergossen, mit circa 5 bis 10 Tropfen einer 10 procentigen Schwefelsäure versetzt und zum Sieden erhitzt. War der Rückstand wirklich Nitrobenzylidendiureid, so wird sich die Flüssigkeit sogleich röthen, infolge Bildung des schon erwähnten, farbigen Körpers — des Phenylhydrazons des ortho-Nitrobenzaldehyds. Mittelst dieser Reaction können 5 mg Harnstoff noch gut nachgewiesen werden, ja sogar in einer Lösung die nur 1 mg Harnstoff enthielt, war dessen Anwesenheit noch zu constatiren.

Es gelang aber nicht auch mittelst dieser Reaction aus dem wässrigen Auszuge von 850 g Hundemuskel Harnstoff nachzuweisen. —

Man könnte immerhin noch einwenden, der Harnstoffgehalt sei so gering, dass bei der von uns verwendeten Muskelmenge der Nachweis nicht möglich sei. Wir haben daher 450 g Liebig'schen Fleischextractes in kaltem Wasser gelöst und mit 10 Proc. Phosphorwolframsäure, der $\frac{1}{10}$ ihres Volumens Salzsäure zugesetzt war, vollkommen ausgefällt. Es waren dazu über 2,5 Kilo krystallisirter Phosphorwolframsäure nöthig. Aus den Versuchen von Gumlich¹⁾ und Schöndorff²⁾ wissen wir, dass Harnstoff in 1—3procentiger Lösung durch Phosphorwolframsäure auch dann nicht gefällt wird, wenn die Lösung Ammoniaksalze und andere stickstoffhaltige Bestandtheile des Harns enthält. — Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde abfiltrirt, ausgewaschen, durch pulverigen Kalk alkalisch gemacht, filtrirt und aus dem Filtrate der Kalk durch oxalsaures Ammon ausgefällt. Das Filtrat vom Kalkoxalat wurde auf dem Wasserbade verdunstet und zur Trennung vom ausgeschiedenen Salmiak mit absolutem Alkohol extrahirt. Der alkoholische Auszug von neuem verdunstet und mit Alkoholäther behandelt, wobei noch etwas Salmiak ungelöst zurückblieb. Jetzt wurde der nach Verdunsten des Alkoholäthers hinterbliebene syrupige Rückstand mit Wasser aufgenommen und mit Zinkoxyd zum Sieden erhitzt, wobei ziemlich viel Ammoniak entwich, von dem noch gelösten Salmiak herrührend. Aus dem Filtrate von überschüssigem Zinkoxyd schieden sich nach dem Verdunsten etwa auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens, Krystalldrusen ab, welche dem Aussehen nach Kreatininchlorzink waren. Die Krystalle wurden abfiltrirt, mit etwas Wasser nachgewaschen und ergaben nach dem Trocknen folgende Zahlen: 0,4931 g der Substanz, in schwach

1) Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. XVII. S. 13.

2) Pflüger's Archiv. Bd. LIV. S. 426.

salzsaurem Wasser gelöst, und in der Siedhitze mit Soda im Ueberschuss gefällt gaben 0,1084 g $\text{ZnO} = 17,64 \text{ Zn}$. Die Formel $(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O})_2 \text{ZnCl}_2$ verlangt 17,95 Proc. Zn.

Das Filtrat von dem ausgeschiedenen Kreatinchlorzink wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelzink abfiltrirt, durch einen Luftstrom vom Schwefelwasserstoff befreit und mit Aether wiederholt extrahirt. In den Aether ging in reichlichen Mengen rechts-Milchsäure über, welche in das Zinksalz verwandelt, durch Krystallwasser- und Zinkbestimmung identificirt wurde. Die von Milchsäure befreite Lösung wurde mit Barytwasser alkalisch gemacht, das überschüssige Baryum durch Kohlensäure entfernt, filtrirt und auf dem Wasserbade verdunstet. Der syrupige Rückstand enthielt noch reichlich Kreatin und Kreatinin, die theilweise auskrystallisirten. Die Mutterlauge der Krystalle gab jedoch, sowohl mit Quecksilberchlorid als auch mit Pikrinsäure krystallinische Niederschläge der entsprechenden Kreatininverbindung. Nach möglichster Entfernung des Kreatin und Kreatinins extrahirten wir die syrupösen Rückstände mit Alkohol und Aether und suchten in den alkoholischen Auszügen Harnstoff nachzuweisen. Die Proben mit ortho-Nitrobenzaldehyd fielen negativ aus. Wurde der alkoholische Rückstand in Wasser gelöst und mit Quecksilberniträt versetzt, so entstand ein geringer weisser Niederschlag, der sich im überschüssigen Quecksilberniträt wieder löste und der sicher nicht die Harnstoffquecksilberverbindung sein konnte, da dieser Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt, dann nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch die Luft, Behandeln mit Baryt und Kohlensäure, ein Filtrat gab, das mit einer Lösung von Diphenylamin in Schwefelsäure nicht die geringste Blaufärbung, d. h. Reaction auf Salpetersäure gab; während alle die Harnstoffverbindungen mit Quecksilberniträt Salpetersäure in ihrem Molekül enthalten. Wir kommen daher zu dem Schluss, dass die Muskel der Säugethiere keine, mit unseren doch sehr empfindlichen Reagentien nachweisbare Harstoffmenge, enthalten.

Nach den Bestimmungen von Hofmeister¹⁾ wird Kreatin in verdünnter, mit Salzsäure versetzter Lösung durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt. Kreatinin giebt mit Phosphorwolframsäure ein krystallinisches Salz schon in Verdünnungen von 1:12,000. Da wir wegen der grossen Masse des Niederschlages in den Filtraten sammt Waschwasser mehr als 15 Liter Flüssigkeit hatten, so war jedenfalls ein Theil des von uns gefundenen Kreatinins schon als solches im

1) Zeitschrift f. phys. Chemie. Bd. V. S. 73.

Fleischextract vorhanden. Ein anderer dürfte von dem gelösten Kreatin herrühren. Die syrupigen, von uns erhaltenen kreatininhaltigen Rückstände, enthalten sicher noch andere, stickstoffhaltige Körper, da die Menge dieses Syrups ganz erheblich ist. Die kürzlich publicirten Untersuchungen von M. Siegfried¹⁾ über Fleischsäure und die von F. Haiser²⁾ über Inosinsäure bringen uns ganz neue Gesichtspunkte über den Stoffwechsel des Muskels und dürften fortgesetzte Untersuchungen der Extractivstoffe des Fleisches noch manche interessante Thatsache nach dieser Richtung hin bringen. Xanthinbasen, oder richtiger durch ammoniakalisches Silber fällbare Substanzen, enthält das Filtrat von Phosphorwolframsäureniederschlag nicht. Das nach Ausfällen mit Phosphorwolframsäure aus dem Filtrate durch Erhitzen mit Phosphorsäure auf 240—270° erhaltene Ammoniak, dürfte hauptsächlich vom Kreatin des Fleisches herkommen. Wenn wirklich Harnstoff im Muskel der Säugethiere vorhanden wäre, so sehen wir nicht ein, warum er nicht daraus darstellbar sein sollte; da er doch z. B. aus dem Muskel der Rochen und Haie nach gleichen Methoden leicht dargestellt werden kann. Ebenso haben wir schon aus 100 g Hundeblood, nach vorausgegangener Fällung mit Phosphorwolframsäure, Harnstoff als ortho-Nitrobenzylidendiureid dargestellt. Der aus der alkoholischen Lösung erhaltene Körper schmolz bei 203° und gab nach dem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure und Zusatz von Phenylhydrazin das Phenylhydrazon des ortho-Nitrobenzaldehyds in Form von rothen Krystallnadeln.

1) Archiv f. Anat. u. Physiol. 1894. Physiol. Abth. S. 401.

2) Wiener Monatshefte für Chemie. Bd. XVI. S. 190. 1895.