

Ueber die Oxydation von Glycocoll, Leucin und Tyrosin, sowie über das Vorkommen der Carbaminsäure im Blute.

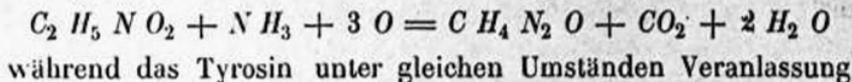
Von

Dr. E. Drechsel.

Es ist eine bemerkenswerthe und auch von Anderen bereits hervorgehobene Thatsache, dass alle stickstoffhaltigen Zersetzungsproducte, welche man durch die Einwirkung von Säuren oder auch Verdauungsfermenten auf Eiweissstoffe in letzter Reihe erhält, nur je Ein Atom Stickstoff im Molekül enthalten. Es ist dies um so merkwürdiger, als nach den Versuchen von *Schultzen* und *Nencki* ¹⁾ derartige Verbindungen, wie Glycocoll, Leucin und Tyrosin beim Durchgang durch den thierischen Organismus eine bedeutend vermehrte Harnstoffausscheidung bewirken, also Veranlassung zur Bildung einer Verbindung geben, welche Zwei Atome Stickstoff im Molekül enthält. Ueber die Art und Weise, wie unter diesen Umständen Harnstoff aus den genannten Körpern entsteht, kann man sich verschiedene Vorstellungen machen; so gibt *Schultzen* z. B. folgende Gleichung als möglich für diesen Process:

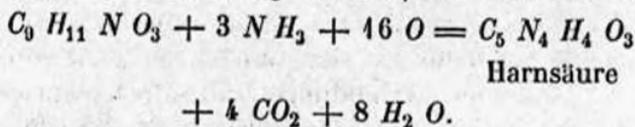


wonach also aus je zwei Molekülen Glycocoll 1 Molekül Harnstoff erhalten würde. Man kann sich indessen auch denken, dass nicht beide Stickstoffatome des Harnstoffs vom Glycocoll stammen, sondern nur eines, und dass das andere von 1 Mol. Ammoniak geliefert wird, welches gleichzeitig mit dem Glycocoll der Oxydation unterliegt. Aus Glycocoll und Leucin könnte so Harnstoff gebildet werden nach der Gleichung für Glycocoll:



1) Zeitschr. f. Biologie, VIII, 124. —

zur Entstehung von Harnsäure und deren Verwandten, Guanin, Xanthin und Sarkin geben würde, indem durch die Oxydation der aromatische Kern desselben gewissermassen gesprengt und die hierbei freiwerdenden Kohlenstoffaffinitäten vom Stickstoff im Entstehungszustande gesättigt würden, nach der Gleichung:



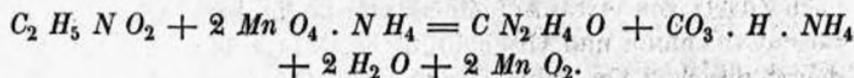
Um die Richtigkeit dieser Vermuthungen experimentell zu prüfen, habe ich mannichfache Versuche angestellt, indem ich Glycocoll, Leucin und Tyrosin in ammoniakalischer Lösung mittelst übermangansauren Ammons oxydirte. Letzteres war durch Zersetzung von übermangansaurem Silberoxyd mit Chlorammonium dargestellt worden; die erhaltene Lösung zersetzte sich nach Zusatz von etwas Ammoniak vollständig beim Kochen unter Gasentwicklung und Abscheidung eines braunen Körpers. Von den zahlreichen Versuchen genüge es, folgende anzuführen.

Glycocoll wurde in wässrigem Ammoniak gelöst und mit einer Lösung von übermangansaurem Ammon versetzt: es fand sofort Einwirkung statt und als dieselbe fast beendigt war, wurde von dem entstandenen Niederschlage abfiltrirt und die Flüssigkeit auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand in Wasser gelöst gab mit Oxalsäure und auch mit salpetersaurem Quecksilberoxyd Niederschläge; letztere wurden abfiltrirt, ausgewaschen und in Wasser suspendirt mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die von dem Schwefelquecksilber abfiltrirte Flüssigkeit wurde eingedampft, mit kohlensaurem Baryt versetzt und auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen, filtrirt und das alkoholische Filtrat auf dem Wasserbade verdampft: der Alkohol hatte keinen Harnstoff aufgenommen. Aus diesem Versuche geht also hervor, dass unter diesen Umständen kein Harnstoff aus Glycocoll entsteht.

Um die gebildeten Oxydationsproducte kennen zu lernen, wurde folgender Versuch angestellt. Glycocoll wurde wiederum in Ammoniak gelöst und mit übermangansaurem Ammon oxydirt; die Flüssigkeit erwärmt sich während der Reaction, jedoch entwickelt sich kein Gas. Nach beendigter Einwirkung (die Flüssigkeit war schwach röthlich gefärbt) wurde abfiltrirt, mit einer Lösung von salpetersaurem Kalk versetzt und nach einiger Zeit

von dem entstandenen Niederschlage abfiltrirt. Dieser erwies sich als ein Gemenge von kohlenurem und oxalurem Kalk. Das Filtrat von demselben zum Kochen erhitzt schied noch mehr kohlenurem und oxalurem Kalk aus. Als Producte der Oxydation des Glycocolls waren also entstanden: Kohlenure, Oxalure, Carbaminsure, Oxaminsure und Wasser.

Zunächst handelte es sich nun darum, zu untersuchen, welche der genannten Verbindungen mit salpetersurem Quecksilberoxyd den vorhin erwählten weissen Niederschlag zu erzeugen vermöchte. Zu diesem Zwecke wurden 2 grm. Glycocoll in wässrigem Ammoniak gelöst und eine Lösung von übermangansurem Ammon hinzugefügt, welche durch Zersetzung von 12 grm. übermangansuren Silberoxyds mit 3 grm. Salmiak erhalten worden war; diese Gewichtsmengen entsprechen sehr annähernd folgender Gleichung:

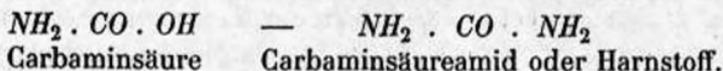


Die Mischung erwärmte sich stark, es fand vollständige Reduction statt. Der Niederschlag wurde abfiltrirt und das Filtrat eingedampft; aus der Flüssigkeit schied sich ein wenig eines krystallinischen Silbersalzes ab, nach dessen Entfernung das klare Filtrat mit salpetersurem Quecksilberoxyd gefällt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde nach dem völligen Auswaschen durch Schwefelwasserstoff zersetzt, die Lösung abfiltrirt und auf dem Wasserbade eingedampft, wobei ein krystallinischer Rückstand blieb. Die Lösung desselben mit Barytwasser gekocht entwickelte Ammoniak und schied oxaluren Baryt aus; die fragliche Substanz war also Oxaminsure. Der Rest derselben wurde mit kohlenurem Baryt auf dem Wasserbade eingedampft und mit Alkohol ausgezogen, dieser nahm jedoch keinen Harnstoff auf.

Aus den mitgetheilten Versuchen geht hervor, dass aus Glycocoll durch Oxydation mittelst Uebermangansure, selbst bei Gegenwart von viel überschüssigem Ammoniak, Harnstoff nicht gebildet wird. Was die aufgeführten Oxydationsproducte anlangt, so ist die Oxaminsure bereits von Engel¹⁾ nachgewiesen, dagegen das Auftreten von Carbaminsure noch nicht beobachtet

1) Compt. rend. t. LXXIX, 808. —

worden. Diese Säure steht in allernächster Beziehung zum Harnstoff; dieser ist das Amid derselben:



Bisher war nur eine Entstehungsweise dieser Säure bekannt, nämlich durch Einwirkung von Kohlensäure auf Ammoniak. Lässt man beide Gase in absolutem Alkohol zusammentreten, so vereinigen sie sich zu carbaminsaurem Ammon, und nach *Kolbe*¹⁾ soll sich dieses Salz auch bilden beim Einleiten von Kohlensäure in wässriges Ammoniak. Hier schien eine neue Bildungsweise vorzuliegen, insofern die Carbaminsäure unter den Oxydationsproducten des Glycocolls auftrat, und es handelte sich zunächst darum, festzustellen, ob die genannte Säure ein wirkliches directes und unmittelbares Oxydationsproduct sei oder ob sie ihre Entstehung nur einem secundären Prozesse, nämlich der gegenseitigen Einwirkung von Kohlensäure und Ammoniak im Entstehungszustande verdanke.

Zur Entscheidung dieser Frage seien noch folgende Versuche angeführt.

Glycocoll wurde in wässriger Lösung mit soviel einer Lösung von übermangansaurem Kali versetzt, dass etwa die Hälfte oxydirt wurde; nach beendigter Reaction wurde die klare Flüssigkeit abfiltrirt, in einem Stöpselcylinder mit etwas frisch bereiteter Kalkmilch versetzt und mit Chlorcalcium gefällt. Nachdem sich der Niederschlag abgesetzt hatte, wurde wiederum filtrirt und die Gegenwart der Carbaminsäure, sowie die Abwesenheit des Ammoniaks durch folgende Versuche erwiesen:

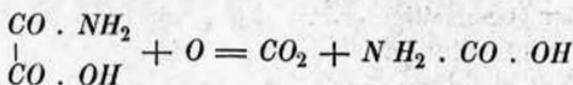
die Flüssigkeit in einer sehr langhalsigen kleinen Retorte zum Sieden erhitzt trübt sich stark durch Ausscheidung von kohlen-saurem Kalk; die während des Kochens entweichenden Dämpfe bläuen stark Lakmus; —

ein Stöpselcylinder wurde bis zum Halse mit der Lösung gefüllt und luftdicht verschlossen; am folgenden Tage hatten sich an den Wandungen lauter kleine Kryställchen von kohlen-saurem Kalk angesetzt, während die Flüssigkeit mit Kalilauge versetzt und filtrirt mit dem *Nessler*'schen Reagens eine stark gelbbraune Fällung gab; —

1) Chem. Wörterbuch, Suppl. pag. 457. —

die Flüssigkeit unmittelbar mit Kalilauge versetzt gab einen weissen Niederschlag, das Filtrat von diesem mit *Nessler'schem* Reagens keine Reaction in der Kälte, beim Kochen aber trat sofort gelbbraune Fällung ein; wurde die Flüssigkeit zuerst einmal aufgekocht und dann mit Kalilauge und *Nessler'schem* Reagens versetzt, so entstand sofort ein starker hellbrauner Niederschlag. —

Bei diesem Versuche war also Carbaminsäure entstanden, trotzdem dass von Anfang an kein Ammoniak zugegen war; Ammoniak wurde ferner während des Processes auch nicht gebildet, oder es wäre wieder vollständig zur Bildung von Carbaminsäure verwandt worden. Da nun nachweislich auch Oxaminsäure durch Oxydation aus Glycocoll entsteht, und man sich die Carbaminsäure recht wohl durch weitere Oxydation aus jener gebildet denken kann:

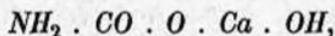


so ist wohl der Schluss gerechtfertigt, dass die Carbaminsäure wirklich als ein Oxydationsproduct des Glycocolls aufzufassen sei. Um aber über die Bedingungen, unter denen sich Carbaminsäure bei Oxydationsprocessen bilden kann, völlig ins Klare zu kommen, erübrigte nur noch, eine stickstofffreie Substanz in ammoniakalischer Lösung zu verbrennen; ich wählte hierzu der Einfachheit halber die Ameisensäure. Ameisensaures Natron wurde in kohlenstofffreiem Ammoniak aufgelöst und hierauf so lange übermangansaures Kali hinzugefügt, bis die Flüssigkeit schwach rosa gefärbt erschien; nach dem Filtriren wurde sie auf die schon beschriebene Art und Weise auf Carbaminsäure geprüft und es fand sich, dass letztere in ziemlicher Menge gebildet worden war. Beiläufig möchte ich an dieser Stelle erwähnen, dass die Versuche mit Leucin und Tyrosin zu denselben Ergebnissen führten wie die mit Glycocoll angestellten, immer fand sich unter den Oxydationsproducten Carbaminsäure.

Aus den vorstehend mitgetheilten Versuchen geht unzweifelhaft hervor, dass sich Carbaminsäure überall da bildet, wo stickstoffhaltige Kohlenstoffverbindungen in alkalischer Lösung verbrannt werden, oder noch allgemeiner ausgedrückt, wo überhaupt Kohlen-

säure und Ammoniak im Entstehungszustande zusammentreffen. Ein solcher Ort aber, wo diesen Bedingungen Genüge geleistet wird, ist der Organismus: hier werden fortwährend stickstoffhaltige Kohlenstoffverbindungen in alkalischen Flüssigkeiten verbrannt; hier ist Kohlensäure und auch Ammoniak im Entstehungszustande gegeben; ja, letzteres kömmt eben deshalb nicht zur Erscheinung, weil es vermuthlich vollständig zur Bildung von Carbaminsäure verwendet wird. Waren diese Vermuthungen und Schlüsse richtig, so war Aussicht vorhanden, Carbaminsäure im Serum des Blutes nachzuweisen¹⁾; ich habe zu diesem Zwecke mehrere Versuche mit Hundebblutserum angestellt und bin dabei folgendermassen verfahren.

Das farblose, klare, centrifugirte Serum wurde zunächst mit dem dreifachen Volum käuflichen absoluten Alkohols gefällt; man nimmt am besten eine grössere Quantität, etwa 150—200 CC. auf einmal in Arbeit. Man filtrirt vom ausgeschiedenen Eiweiss ab und versetzt die alkoholische Flüssigkeit mit einer ziemlich concentrirten wässrigen Lösung von Chlorcalcium; es entsteht zunächst eine geringe Trübung, welche sich schnell zu grossen Flocken zusammenballt und absetzt. Dieser Niederschlag, welcher albuminoide Körper enthält; wird abfiltrirt und die Flüssigkeit mit soviel einer reinen wässrigen Kalilauge (von 20%) versetzt, bis die Reaction deutlich alkalisch ist; unter diesen Umständen entsteht ein voluminöser kleisterähnlicher Niederschlag, welcher Kalkhydrat, etwas kohlen-sauren und carbaminsauren Kalk enthält, letzteren vielleicht als basisches Salz:



und etwas Extractivstoff. Man filtrirt ihn ab, wäscht ihn einmal mit absolutem Alkohol, presst ihn möglichst zwischen Fliesspapier ab und trocknet ihn über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur. Der ganz trockne Niederschlag wird nun fein gerieben und in einem luftdicht verschlossenen Gefässe einige Zeit mit destillirtem Wasser geschüttelt; man lässt absitzen und bringt die klar filtrirte Flüssigkeit in eine mit Wasserstoffgas gefüllte Retorte, wobei man sich zweckmässig folgender kleinen

1) Bekanntlich hat auch *Schultzen* die Vermuthung ausgesprochen, dass Carbaminsäure im Organismus gebildet werde, und *E. Salkowski* die Taurocarbaminsäure im Harn nach Genuss von Taurin gefunden (Ber. deutsch. chem. Gesellsch. VI, 744). —

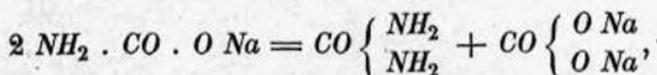
Vorrichtung bedient: An eine mit einem Hahn versehene Trichterröhre löthet man unterhalb des Hahnes seitlich eine Gasleitungsröhre an und setzt das Ganze in den Tubulus der Retorte ein; die Flüssigkeit filtrirt man zweckmässig direct in den Trichter, während man die Retorte mit Wasserstoffgas füllt, und ist dies geschehen, so öffnet man den Hahn und die Flüssigkeit fliesst in die Retorte, ohne dass Luft mit hineingelangt.

Nachdem die Flüssigkeit in die Retorte gefüllt ist, wird sie allmählig zum Sieden erhitzt, wobei der entweichende Gasstrom durch verdünnte reine Salzsäure streichen muss; letztere wurde nach viertelstündigem Sieden gewechselt. Schon bevor die Flüssigkeit ins Kochen geräth, trübt sie sich und während des Siedens bildet sich stets ein Niederschlag in grösserer oder geringerer Menge; nach halbstündigem Kochen wurde der Versuch unterbrochen, und im Wasserstoffstrom erkalten gelassen. Der Niederschlag wurde nach dem Absitzenlassen und Decantiren der überstehenden Flüssigkeit in ein Probirröhrchen gebracht, schnell etwas erwärmt und ein Tropfen conc. Salzsäure hinzugefügt: er löste sich unter schwachem Aufbrausen. Der an der inneren Wandung der Retorte sitzen gebliebene Antheil des Niederschlages wurde rasch mit Wasser abgespült, soviel als möglich abtropfen gelassen und ebenfalls mit einem Tropfen concentrirter Salzsäure geprüft, auch hier fand Lösung unter schwachem, aber vollkommen deutlichem Aufbrausen statt. Zu bemerken ist noch, dass dieser an der Retortenwandung fest-sitzende Theil des Niederschlages deutlich krystallinisch erschien. In der vorgeschlagenen Salzsäure liess sich leicht nach Uebersättigen mit Kalilauge durch *Nessler'sches* Reagens Ammoniak nachweisen und zwar in der ersten Parthie immer viel mehr als in der zweiten, welche nur Spuren davon enthielt.

Durch die mitgetheilten Versuche, welche nicht nur einmal, sondern mehrere Male angestellt wurden und mit Ausnahme eines einzigen zweifelhaften stets dasselbe positive Resultat ergeben haben, ist mit voller Sicherheit nachgewiesen, dass im Serum des Hundesblutes Carbaminsäure, resp. ein Salz derselben vorkömmt. Ich habe mich durch einen besonderen Versuch überzeugt, dass eine verdünnte Lösung von reinem carbaminsaurem Ammon mit 3 Vol. Alkohol und etwas Chlorcalcium versetzt ganz klar bleibt, dass aber der gelatinöse Niederschlag, welcher durch Kalilauge in dieser Flüssigkeit erzeugt wird, nach

dem Waschen und Trocknen, überhaupt auf dieselbe Art und Weise untersucht, wie oben für den Niederschlag aus Serum angegeben wurde, ebenfalls die Reactionen der Carbaminsäure zeigt, beim Kochen seiner Lösung scheidet sich kohlensaurer Kalk aus unter Entweichen von Ammoniak. Eine Verwechslung eines anderen Körpers mit Carbaminsäure ist nicht möglich; Harnstoff wird unter den obwaltenden Umständen nicht gefällt, auch Cyansäure ist ausgeschlossen, denn als eine Portion des feingeriebenen Niederschlags in eine Lösung von schwefelsaurem Ammon eingetragen und einige Zeit mit dieser erhitzt wurde, konnte im Filtrat durch Neutralisiren mit Schwefelsäure, Abdampfen auf dem Wasserbade, Ausziehen mit Alkohol, Filtriren und Abdampfen der alkoholischen Flüssigkeit kein Harnstoff nachgewiesen werden; der Rückstand war nur ein wenig mit einer Spur organischer Substanz verunreinigtes Ammonsalz.

Die Thatsache, dass Carbaminsäure sich überall bildet, wo Kohlensäure und Ammoniak im Entstehungszustande zusammen treffen, sowie dass diese Säure sich im Blute findet, ist wohl geeignet, ein neues Licht auf die Bildung des Harnstoffes im thierischen Organismus zu werfen. Aus carbaminsauren Salzen hat man schon mehrfach Harnstoff dargestellt, so *Basarow*¹⁾ durch einfaches Erhitzen des carbaminsauren Ammons in einer zugeschmolzenen Röhre auf 130—140° C., ferner habe ich²⁾ nachgewiesen, dass bei der Einwirkung von Wasser auf Natriumcyanid bei ca. 450° C. das zunächst gebildete carbaminsaure Natron zerfällt in Harnstoff und kohlensaures Natron:



es liegt also der Schluss nahe, es möchte das im Serum vorhandene carbaminsaure Salz im lebenden Organismus eine ähnliche Zersetzung erleiden, etwa durch ein Ferment. Unter dieser Annahme würde sich für die Entstehung des Harnstoffes im Thierkörper folgender Weg ergeben: Zersetzung der albuminoiden Körper in die längst gekannten Producte: Leucin, Tyrosin, Glycocoll, Ammoniak u. s. w. Diese liefern bei der Oxydation direct und indirect Carbaminsäure, welche mit dem vorhandenen

1) Ann. Chem. Pharm. CXLVI, 442. —

2) Journ. f. pr. Chem. [2], XI, 329. —

Natron in Verbindung tritt. Das entstandene carbaminsaure Salz aber zerfällt dann unter dem Einfluss irgend eines Fermentes in Harnstoff und kohlensaures Salz. Ich bin noch mit Versuchen beschäftigt, um diese Zersetzung thatsächlich nachzuweisen und behalte mir spätere Mittheilungen hierüber vor.

Leipzig, den 20. Juli 1875.