

# Über die Bindung von Kohlensäure durch amphotere Amidokörper.

## II. Mitteilung.

Von

**M. Siegfried.**

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. November 1905.)

### I. Zur Lehre der Bindung der Kohlensäure im Blutserum.

Vor kurzem habe ich mitgeteilt,<sup>1)</sup> daß Amidosäuren bei Gegenwart von Alkalien oder Erdalkalien durch Kohlensäure in die Salze von Carbaminosäuren übergeführt werden. Ebenso wie die einfachen Amidosäuren ließ sich die Bildung von Carbaminosäuren bei Pepton und krystallisiertem Serumalbumin nachweisen.

In letzterem Falle, beim Nachweis der Entionisierung der Kohlensäure durch Serumalbumin blieb, wie ich ausgeführt habe,<sup>2)</sup> der Einwand bestehen, daß Calciumcarbonat kolloid in Lösung gehalten wurde. Bei diesen Versuchen war die bis zum Verschwinden der  $\text{SO}_4$ -Reaktion dialysierte Lösung des krystallisierten Serumalbumins unter wiederholtem Zusatz von Kalkmilch in Eiswasserkühlung mit Kohlensäure gesättigt worden, dann nach Vermischen mit Kalkmilch und krystallisiertem Calciumcarbonat und gutem Durchschütteln zentrifugiert worden. In der abgehobenen Flüssigkeit, welche kein Calciumcarbonat

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 85.

<sup>2)</sup> Ebenda, S. 93.

mikroskopisch erkennen ließ, wurde im Kohlensäurebestimmungsapparate mit Weinsäure die Kohlensäure ausgetrieben. Die so erhaltene Kohlensäure entsprach — vorausgesetzt, daß sich in der Lösung trotz Schüttelns mit krystallisiertem Calciumcarbonat nicht kolloides Calciumcarbonat befunden hatte — der durch das Serumalbumin unter Bildung von carbaminosaurem Salz entionisierten Kohlensäure.

Herr Geheimrat Ostwald hatte die Freundlichkeit, mich darauf aufmerksam zu machen, daß sich wahrscheinlich die Frage, ob hier Eiweißcarbaminat entstanden war, mit Hilfe der Bestimmung der Leitfähigkeit beantworten ließe, in dem das Carbaminat voraussichtlich eine merkliche Leitfähigkeit besäße, das kolloide Calciumcarbonat jedoch nicht.

Daher habe ich diese Frage auf Grund folgender Überlegung zu beantworten gesucht.

Aus der Leitfähigkeit der nach Einleiten von Kohlensäure und Schütteln mit Kalkmilch erhaltenen Lösung Schlüsse auf die stattgefundene Bildung von Eiweißcarbaminat zu ziehen, ging nicht an, da in der Lösung nicht bestimmbare Mengen von Calciumoxydhydrat vorhanden sind. Wohl aber mußte die Leitfähigkeit der Lösung allmählich abnehmen, wenn Carbaminat entstanden war, konstant bleiben, wenn kein Carbaminat entstanden war, sondern nur kolloides Calciumcarbonat die Quelle der Kohlensäure in den angeführten Versuchen war. Denn im ersteren Falle mußte allmähliche Zersetzung des Carbaminates unter Bildung von Eiweiß und Calciumcarbonat erfolgen, die beide keine oder sehr geringe Leitfähigkeit besitzen. Im zweiten Falle hingegen mußte die Leitfähigkeit konstant bleiben, da kolloides Calciumcarbonat höchstens in nicht kolloides übergehen konnte, wodurch die Leitfähigkeit der Lösung nicht merklich geändert würde.

Zu den Versuchen diente Rinderserum, welches 3 Wochen in stark fließendem Leitungswasser dialysiert war. Die Leitfähigkeit des so dialysierten Serüms war sehr gering und fast gleich der des verwendeten Leitungswassers.



Spezifische Leitfähigkeit des Leitungswassers:

$$R = 1100 \text{ Ohm, } T. = 25^{\circ}$$

$$\kappa = 3,224 \times 10^{-4}$$

Spezifische Leitfähigkeit des dialysierten Rinderserums:

$$R = 1100 \text{ Ohm, } T. = 25^{\circ}$$

$$\kappa = 3,554 \times 10^{-4}$$

Bei der Ausführung der folgenden Versuche war zu berücksichtigen, daß die Lösung kein ungelöstes Calciumoxydhydrat enthalten durfte, da sonst, weil die Lösung nicht an Calciumoxydhydrat gesättigt sein konnte, allmählich durch weiteres Aulösen von Calciumoxydhydrat das Leitungsvermögen erhöht wurde; ferner war während der Versuche die Kohlensäure der Luft auszuschließen, da andernfalls durch Überführung gelösten Calciumoxydhydrates in Calciumcarbonat das Leitungsvermögen vermindert wurde. Der Ausschluß von Kohlensäure gelang leicht durch Überschichten von Benzol im Leitfähigkeitsgefäße.

Daß unter Beobachtung dieser Vorsichtsmaßregeln keine Änderung der Leitfähigkeit des mit Kalkmilch behandelten Serums, wenn keine Kohlensäure eingeleitet worden war, erfolgte, zeigt folgender blinder Versuch:

Serum wurde mit Kalkmilch geschüttelt, zentrifugiert, die abgehobene Lösung im Leitfähigkeitsgefäße mit Benzol überschichtet:

$$R = 100 \text{ Ohm, } T. = 25^{\circ}$$

Minuten	$\kappa$
45	$4,044 \times 10^{-3}$
75	4,005
105	4,006
164	4,029
215	4,060
360	4,129

Bei den folgenden Versuchen wurde in das dialysierte Rinderserum Kohlensäure geleitet, etwas Kalkmilch zugegeben, geschüttelt, wieder Kohlensäure eingeleitet, wieder Kalkmilch zugegeben und scharf zentrifugiert. Mit der abgehobenen Flüssigkeit wurde das Leitfähigkeitsgefäß beschickt. Mit der Pipette wurde hierin nach Einführung der Elektroden die Flüssigkeit mit einer ca. 1 cm hohen Schicht Benzols gedeckt.

## Versuch I.

$$R = 300 \text{ Ohm, } T. = 25^{\circ}$$

Minuten	$\kappa$
15	$1,173 \times 10^{-3}$
28	1,130
35	1,117
55	1,087
65	1,073
85	1,062
98	1,056
158	1,044
300	1,038
380	1,038

Die Leitfähigkeit hatte also beständig abgenommen. Die Differenz der zuletzt konstant bleibenden Leitfähigkeit und der anfänglichen ergibt  $0,145 \times 10^{-3}$ . Sie entspricht der Leitfähigkeit des ursprünglich vorhandenen carbaminosauren Salzes. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß diese ursprünglich vorhandene Menge des Carbaminates abhängt von der Dauer der Kohlensäureeinwirkung auf das mit Kalkmilch vermischte Serum und von dem Grade der schon bei Beginn der Leitfähigkeitsbestimmung stattgefundenen Umwandlung des carbaminosauren Salzes in Eiweiß und Calciumcarbonat.

## Versuch II.

Anordnung wie in Versuch I.

$$R = 200 \text{ Ohm, } T. = 25^{\circ}$$

Minuten	$\kappa$
15	$1,927 \times 10^{-3}$
17	1,925
20	1,813
29	1,810
33	1,772
43	1,738
85	1,649
103	1,630
128	1,608
423	1,586

Die spezifische Leitfähigkeit hatte auch hier beständig abgenommen. Die Gesamtabnahme betrug  $0,341 \times 10^{-3}$ , war also größer als im Versuch I. Die Verschiedenheit der absoluten Größen der spezifischen Leitfähigkeit bei verschiedenen Ver-



suchen ist durch verschiedene Konzentration und verschiedenen Gehalt an Calciumoxydhydrat der Lösungen bedingt.

Versuch III.

Anordnung wie in Versuch I und II.

$$R = 200 \text{ Ohm, } T. = 25^{\circ}$$

Minuten	$\kappa$
15	2,309 $\times 10^{-3}$
20	2,200 "
25	2,103 "
35	1,967 "
50	1,801 "
75	1,658 "
91	1,584 "
108	1,539 "
128	1,492 "
147	1,467 "
195	1,419 "
225	1,403 "
345	1,367 "
460	1,351 "
520	1,345 "
1450	1,335 "

Die Gesamtabnahme der Leitfähigkeit ist hier die größte unter den 3 Versuchen; bis zur 520. Minute beträgt sie  $0,964 \times 10^{-3}$ . Auch hier fällt die Leitfähigkeit ganz allmählich ab.

In allen Versuchen schied sich während des Versuches Calciumcarbonat sichtbar ab. Daß dadurch, daß sich dieses Calciumcarbonat auch auf den Elektroden absetzte, kein Fehler in der Bestimmung entstand, lehrte folgender Versuch.

In dem Leitfähigkeitsgefäße, in das die Elektroden eingesetzt waren, wurde über Nacht die klare wässrige Lösung von carbaminopropionsaurem Calcium bei  $25^{\circ}$  belassen. Durch die langsame Zersetzung desselben entstand gerade wie im Serum allmählich Calciumcarbonat, daß sich ebenso wie bei den Serumversuchen zum Teil auf den Elektroden absetzte. Nach vorsichtigem Ausheben der Elektroden wurde das Leitfähigkeitsgefäß entleert, anhaltend mit Leitfähigkeitswasser ausgespült, wobei gleichzeitig die Elektroden durch vorsichtiges Einsenken und längeres Verweilenlassen in der Flüssigkeit ausgespült wurden, ohne daß das niedergeschlagene Calciumcarbonat

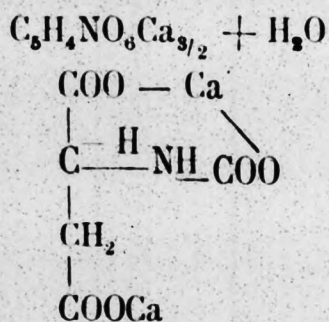
merklich von den Elektroden entfernt wurde. Dieselbe Manipulation wurde 3mal mit  $n/50$ -KCl ausgeführt, nach der 4. und 5. Füllung des Gefäßes mit der Kaliumchloridlösung das spezifische Leitungsvermögen bestimmt. Dasselbe betrug für  $n/50$ -KCl bei  $25^\circ$  0,002763 anstatt 0,002768, war also gleichgroß, gleichviel, ob die Elektroden einen Belag von Calciumcarbonat hatten oder nicht.

Die Versuche beweisen, daß im Rinderserum durch Kohlensäure bei Gegenwart überschüssigen Calciumoxydhydrates Verbindungen entstehen, welche sich allmählich unter Bildung von nicht oder weniger leitenden Stoffen zersetzen. Nach den früher mitgeteilten Untersuchungen über die Einwirkung von Kohlensäure auf amphotere Amidokörper ist der Schluß gerechtfertigt, daß sich aus Eiweißkörpern des Blutserums durch Kohlensäure bei Gegenwart von Calciumoxydhydrat Kalksalze von Eiweißcarbaminosäuren bilden. Die Bedeutung der Reaktion der Kohlensäure auf amphotere Amidokörper für die Bindung der Kohlensäure im Blutserum ist somit sicher gestellt.

## II. Reindarstellung der Kalksalze von Carbaminosäuren.

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> habe ich über die Reindarstellung der Kalksalze der Carbaminoessigsäure, Carbamino-propionsäure, Carbaminoisokapronsäure, Carbomethylaminoessigsäure und Carbophenylaminoessigsäure berichtet. Die Kalksalze der folgenden Carbaminosäuren wurden in analoger Weise wie jene erhalten. Zur Analyse waren die erst über Schwefelsäure im Vacuum getrockneten Substanzen bei  $100^\circ$  bis zum konstanten Gewichte erhitzt.

### Carbaminobernsteinsaures Calcium aus Asparaginsäure-Kahlbaum.



<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 90.





## Lysincarbonsaures Calcium.

Die Diaminokapronsäure kann theoretisch 2 Carbaminsäuren bilden, indem entweder eine oder beide Aminogruppen mit Kohlensäure reagieren. Bei zwei Darstellungen aus aktivem r-Lysin wurde glatt das Calciumsalz der Dicarbaminsäure erhalten.

Die Lösung von Lysinchlorid, das über das Platinsalz aus Glutokyrin erhalten war, wurde direkt mit Kalkmilch versetzt, Kohlensäure eingeleitet usw. Das mit Alkohol ausgeschiedene und gewaschene Calciumsalz war chlorfrei.

## Analysen:

I. 0,1175 g Substanz gaben 0,0833 g  $\text{CaSO}_4$

II. 0,0878 „ „ „ 7,6 ccm N, 750 mm, T. 18°.

1 g Lysinchlorid aus Hühnereiweiß durch Spaltung mit Salzsäure über das Platinsalz erhalten wurde durch Phosphorwolframsäure in die freie Diaminosäure übergeführt, diese mit Kalkmilch und Kohlensäure behandelt usw. Ausbeute an Calciumsalz: 1,3 g.

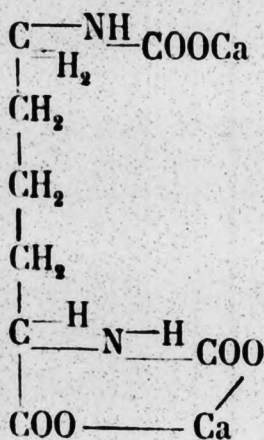
## Analysen:

I. 0,1879 g Substanz gaben 0,1302 g  $\text{CaSO}_4$ ;

II. 0,2174 „ „ „ 17,0 ccm N, 13°, T. 753 mm Bar.;

III. 0,2362 „ „ „ 0,2823 g  $\text{CO}_2$  und 0,0933 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Die Analysen führen zu der Formel  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_6\text{Ca}_{1/2}$ , oder



## Gefunden:

I. II.

Ca = 20,81% 20,35%

N = 10,02% 9,25%

C = 32,55%

H = 4,36%

## Berechnet:

20,60%

9,65%

32,96%

3,81%



Die Konstitution des Salzes wurde bestätigt durch Bestimmung des beim Kochen der wässerigen Lösung abspaltbaren Calciumcarbonates.

0,2464 g büchsentrockenes Salz = berechnet bei 100° getrocknetes Salz:

0,2294 g gaben beim Kochen mit Wasser 0,1183 g  $\text{CaCO}_3$ .

Gefunden:

Ca = 20,63%

Berechnet:

20,60%

Es war also das gesamte Ca als  $\text{CaCO}_3$  abspaltbar.

E. Drechsel und Th. R. Krüger<sup>1)</sup> haben einmal durch Eindampfen von Lysin einen krystallinischen Rückstand erhalten, den sie als kohlen-saures Salz ansahen. Die Analyse stimmte auf die Zusammensetzung  $2\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2$ , sodaß sie die Meinung aussprachen, die Substanz sei vielleicht lysincarbaminsaures Lysin. Nach meinen Befunden über das Verhalten von Lysin zu Kohlensäure ist dies unwahrscheinlich.

Ich habe überdies 3 g Lysinchlorid genau wie Drechsel und Krüger behandelt, erst in das Sulfat übergeführt, in der Lösung des Sulfates mit Barytwasser genau die Schwefelsäure gefällt und das Filtrat eingedampft.

Die Analysen der über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewichte getrockneten Substanz lieferten andere Werte, als Drechsel und Krüger fanden.

I. 0,1567 g gaben 0,1146 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,2739 g  $\text{CO}_2$ ;

II. 0,1290 „ „ 23,1 ccm N, 746 mm Bar., 18° T.

Gefunden:

Werte von Drechsel und Krüger:

C = 47,67%

46,19%

H = 8,12%

8,13%

N = 20,62%

16,83%

### Arginincarbon-saures Calcium.

Das Arginin, aus Hühnereiweiß durch Salzsäurespaltung dargestellt, gibt ebenfalls die Carbaminsäurereaktion mit Kalkmilch und Kohlensäure sehr deutlich; hingegen stellten sich der Reindarstellung des Kalksalzes Schwierigkeiten entgegen, die Ausfällung durch Alkohol war oft nicht möglich, weil das Salz in sehr feiner, nicht rasch filtrierbarer Form gefällt wurde.

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXV. S. 2455.





Alkalien oder Erdalkalien unter Bildung von Carbaminaten gebunden werden kann, indem basische Gruppen desselben Moleküls oder anderer die Salzbildung übernehmen. Hingegen würde von einfachen Amidosäuren, also von Glycocoll und seinen Homologen, Kohlensäure nur gebunden, d. h. entionisiert werden können, wenn die freien Carbaminosäuren eine gewisse Beständigkeit in wässriger Lösung haben. Nach vorläufigen, in der ersten Mitteilung besprochenen Versuchen, bei denen die Menge der absorbierten Kohlensäure bestimmt wurde, schien das Glycocoll bei 0° geringe Mengen, bei Zimmertemperatur keine Kohlensäure binden zu können.

Diese Frage schien in einwurfsfreier Weise mit Hilfe der Leitfähigkeitsmethode beantwortet werden zu können. Wenn durch Glycocoll in wässriger Lösung Kohlensäure unter Bildung von Carbaminosäure gebunden wird, so wird eine mit Kohlensäure gesättigte Lösung von Glycocoll eine größere Leitfähigkeit besitzen, als die der Kohlensäure in wässriger Lösung plus der des Glycocolls beträgt; denn schon aus dem Umstande, daß die Baryumsalze der Carbaminoessigsäure nur langsam und unvollkommen durch Einleiten von Kohlensäure in deren wässrige Lösung zersetzt werden, ferner aus der Analogie mit anderen Carbonsäuren ist zu schließen, daß die Carbaminosäuren eine höhere Leitfähigkeit besitzen als Kohlensäure. Sollte dies wieder Erwarten nicht der Fall sein, so würde, auch wenn sich in wässriger Lösung freie Carbaminosäuren bilden, die Leitfähigkeit nicht höher gefunden werden. Ist sie aber größer, als die von Glycocoll + Wasser + Kohlensäure, so beweist eine beobachtete höhere Leitfähigkeit auf jeden Fall die Existenz freier Carbaminsäuren in wässriger Lösung, denn eine Carbonatbildung kommt nicht in Betracht.

Bei den folgenden Versuchen wurde die Lösung der Amidosäure, deren Leitfähigkeit vorher ermittelt worden war, durch ein Kapillarrohr, das kurz über der oberen Elektrode mündete, mit Kohlensäure, die zuletzt durch Leitfähigkeitswasser gewaschen war, gesättigt. Die Ablesungen auf der Brücke wurden bis zur Konstanz gemacht, d. h. bis nach einem Zeitraum von 10 Minuten durch Kohlensäure die Werte nicht mehr stiegen. Dazwischen wurde

öfters die Flüssigkeit im Leitfähigkeitsgefäß durch Heben und Senken der Elektroden gemischt. In Parallelversuchen wurde die Leitfähigkeit von Wasser, das unter gleichen Bedingungen mit Kohlensäure behandelt wurde, bestimmt. Diese Bestimmungen geschahen unmittelbar nach jedem Versuche mit Amidosäuren, da die spezifische Leitfähigkeit des mit Kohlensäure gesättigten Wassers vom Barometerdruck abhängt. Wenn auf diese Weise auch keine ganz völligen Sättigungen mit Kohlensäure erzielt wurden, war doch in allen Versuchen eine gleichmäßige, fast völlige Sättigung erreicht worden.

**Glycocoll.** Versuch I. Das analysenreine Präparat wurde 3mal aus Leitfähigkeitswasser umkrystallisiert.

Für die spezifische Leitfähigkeit der Normallösung wurde gefunden bei 25°:

$$\kappa = 3,466 \times 10^{-5},$$

abzüglich der Leitfähigkeit des Wassers =  $3,216 \times 10^{-5}$ .

In 3 Versuchen wurde nach Sättigen der Normal-Glycocoll-lösung mit Kohlensäure bei 25° gefunden für:

$$\text{ad} = 1. 33,70\% \quad 2. 33,90\% \quad 3. 33,85\%$$

bei R = 1100.

Für den Durchschnittswert ad = 33,82 berechnet sich

$$\kappa = 1,791 \times 10^{-4}.$$

Die spezifische Leitfähigkeit des mit CO<sub>2</sub> gesättigten Wassers betrug:

$$\kappa = 4,644 \times 10^{-5}.$$

Da die spezifische Leitfähigkeit des Wassers =  $2,5 \times 10^{-6}$  war, betrug die Leitfähigkeit der Kohlensäure im Wasser:

$$\kappa = 4,394 \times 10^{-5}.$$

Die durch die Kohlensäure bewirkte Zunahme der spezifischen Leitfähigkeit der Glycocolllösung =

$$1,791 \times 10^{-4} - 3,466 \times 10^{-5} = 1,444 \times 10^{-4}$$

sie ist also rund 3,3 mal so groß als die der Kohlensäure in Wasser, woraus zu schließen ist, daß Carbaminoessigsäure in freiem Zustande aus Glycocoll und Kohlensäure in wässriger Lösung entsteht.

Versuch II. Das hier verwendete Glycocoll war ebenfalls 3mal aus Leitfähigkeitswasser umkrystallisiert. Es besaß ein noch geringeres Leitungsvermögen als Präparat I.



$$R = 10000, T. = 25^{\circ}$$

V	$\kappa$	$\mu$
1	$2,253 \times 10^{-5}$	0,02253
2	$1,152 \times 10^{-5}$	0,02284
4	$6,015 \times 10^{-6}$	0,02406
8	$2,981 \times 10^{-6}$	0,02384

Bei diesen Werten ist die Leitfähigkeit des Wassers abgezogen.

Die Lösungen des Glycocolls nach Sättigen mit Kohlensäure wie in Versuch I gaben folgende Werte bei den verschiedenen Verdünnungen:

$$R = 1000, T. = 25^{\circ}$$

V	$\kappa$
1	$1,553 \times 10^{-4}$
2	$1,267 \times 10^{-4}$
4	$8,918 \times 10^{-5}$
8	$6,550 \times 10^{-5}$

Für  $\kappa$  des mit Kohlensäure gesättigten Wassers wurde gefunden:  $4,987 \times 10^{-5}$ , nach Abzug der Leitfähigkeit des Wassers also:  $4,737 \times 10^{-5}$ .

Die durch Einleiten von Kohlensäure bewirkte Erhöhung der Leitfähigkeit der Glycocollösung war also in allen Fällen wieder viel höher, als die Leitfähigkeit der Kohlensäure in Wasser betrug, denn:

V	$\kappa$ Glycocoll + CO <sub>2</sub>	$-\kappa$ Glycocoll	T. = 25°
1	$1,30 \times 10^{-4}$		
2	$1,13 \times 10^{-4}$		
4	$8,07 \times 10^{-5}$		
8	$6,00 \times 10^{-5}$		

**Alanin.** Versuch III. Das i-Alanin war ebenfalls 3mal aus Leitfähigkeitswasser umkrystallisiert.

Unter Abzug des Wertes der spezifischen Leitfähigkeit des Wassers wurden folgende Zahlen erhalten:

V	$\kappa$	$\mu$	T. = 25°
1	$5,459 \times 10^{-5}$	0,0549	
2	$3,20 \times 10^{-5}$	0,064	
4	$1,82 \times 10^{-5}$	0,0728	
8	$9,84 \times 10^{-6}$	0,0787	

Während bei dem Glycocoll die molekulare Leitfähigkeit schon nach der Verdünnung 1 nicht merklich anstieg, ist sie hier bei  $V = 4$  und 8 beträchtlich größer als bei  $V = 1$ .

Nach Sättigen mit Kohlensäure wurden folgende Werte erhalten :

V	$\kappa$	T. = 25°
1	$2,0125 \times 10^{-4}$	
4	$1,1727 \times 10^{-4}$	
8	$6,925 \times 10^{-5}$	

Unmittelbar nach diesem Versuche wurde gefunden.

$$\kappa_{\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}} = 5,028 \times 10^{-5}, \text{ also } \kappa_{\text{CO}_2} = 4,778 \times 10^{-5}.$$

Die durch Einleiten von Kohlensäure bewirkte Erhöhung der Leitfähigkeit der Alaninlösung war also in allen Fällen höher als die Leitfähigkeit der Kohlensäure in Wasser; die hier erhaltenen Werte sind den beim Glycocoll gewonnenen sehr ähnlich :

V	$\kappa_{\text{Alanin} + \text{CO}_2}$	$-\kappa_{\text{Alanin}}$
1	$1,44 \times 10^{-4}$	
4	$9,66 \times 10^{-5}$	
8	$5,69 \times 10^{-6}$	

Diese Versuche ergeben, daß die in der Überschrift des dritten Abschnittes gestellte Frage dahin zu beantworten ist:

Amphotere Amidokörper, Glycocoll und Alanin, bilden in wässriger Lösung mit Kohlensäure freie Carbaminosäuren.