

Über die Anwendung der Carbaminoreaktion.

V. Mitteilung.

Von

H. Liebermann.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)
(Der Redaktion zugegangen am 5. Oktober 1908.)

In dieser Abhandlung, die aus äußeren Gründen einen etwas vorzeitigen Abschluß gefunden hat, wird die Anwendung der Carbaminoreaktion auf mehrere Stickstoff im Ringe enthaltende Verbindungen sowie auf einige noch nicht daraufhin untersuchte Eiweißspaltungsprodukte bezw. in physiologischer Hinsicht interessante Substanzen beschrieben.

Von Verbindungen, die Stickstoff in ringförmiger Bindung enthalten, wurden untersucht: Piperazin, Piperidin, Coniin und Tetrahydrochinolin, ferner mehrere Indolderivate, nämlich Indol selbst, Skatol und Indigo in Form seiner Disulfosäure. Die angewandten Präparate waren, wenn nichts anderes angegeben, von der Firma Kahlbaum bezogen. Die Ausführung der Carbaminoreaktion, die nach der Vorschrift von M. Siegfried und C. Neumann¹⁾ geschah, gestaltete sich folgendermaßen: Die betreffende Substanz wurde in Wasser gelöst, ein Körnchen Phenolphthalein²⁾ und ca. 10 ccm Kalkmilch (dargestellt aus 1 Liter Wasser und 150 g CaO) zugefügt, auf 4° abgekühlt und unter Kühlung mit Eiswasser Kohlensäure bis zur schwachen Rosafärbung in die Flüssigkeit eingeleitet. Dann wurden noch zweimal abwechselnd je 10 ccm Kalkmilch zugesetzt und unter steter Kühlung Kohlensäure bis fast zum Verschwinden der alkalischen Reaktion eingeleitet. Zum Schluß wurde die Flüssigkeit bis zur starken alkalischen Reaktion mit Kalkmilch (10 bis 20 ccm) geschüttelt. Nun wurde abgesaugt, das stets klare Filtrat mit etwa der gleichen Menge ausgekochten Wassers verdünnt und in einem Erlenmeyer-Kolben, der mit einem Gummistopfen verschlossen war, durch dessen Bohrung ein abwärts gebogenes Natronkalkrohr ging, 20 Stunden bei ca. 20° stehen gelassen. Nach dieser Zeit war die Zersetzung des betreffenden Calciumcarbaminates in Calciumcarbonat und Ausgangssubstanz in allen Fällen vollendet. (Die Zersetzung geschah

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. LIV, S. 424. ²⁾ Betr. Indigodisulfosäure s. weiter u.

nicht durch Aufkochen wegen der, wenn auch geringen, Flüchtigkeit dieser Substanzen mit Wasserdämpfen.)

Das abgeschiedene Calciumcarbonat wurde auf einem Neubauer-Tiegel abgesaugt, mit Wasser gut ausgewaschen und bis zur Gewichtskonstanz bei 130—140° getrocknet; im Filtrat wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Bei der Indigodisulfosäure, die in stark alkalischer Lösung grün, in neutraler blau gefärbt ist, wurde die Kohlensäure jedesmal bis zur beginnenden Blaufärbung eingeleitet. Hier konnte auch die Zersetzung der Carbaminverbindung durch Aufkochen der Lösung bewirkt werden.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung sämtlicher Versuche und der dabei erhaltenen Resultate.

$$\frac{\text{CO}_2}{\text{N}} = \frac{1}{x}$$

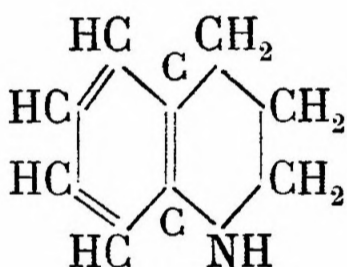
	g CaCO ₃	ccm n/10-Säure	x	x im Mittel
1. Piperazin: 0,13 g in 80 ccm Wasser	0,1251	11,75	0,94	0,95
0,20 » » 80 » »	0,1757	15,70	0,89	
0,20 » » 80 » »	0,1570	16,10	1,03	
2. Piperidin: 0,20 g in 80 ccm Wasser	0,1644	15,0	0,91	0,93
0,20 » » 80 » »	0,1130	10,7	0,95	
3. Coniin: 0,18 g in 100 ccm Wasser	0,0500	9,1	1,82	1,56
0,18 » » 100 » »	0,0760	9,8	1,29	
0,18 » » 100 » »	0,0610	9,7	1,59	
0,13 » » 130 » »	0,0462	6,8	1,47	
0,13 » » 130 » »	0,0320	5,4	1,69	
4. Tetrahydrochinolin: 0,20 g in 80 ccm W.	0,0296	12,1	4,09	4,07
0,30 » » 100 » »	0,0392	15,9	4,05	
5. Indol: 0,13 g in 80 ccm Wasser	0,0106	1,35	—	
6. Skatol: 0,15 » » 100 » »	0,0128	1,1	—	
7. Indigkarmin: 0,22 » » 100 » »	0,0164	1,7	—	

Diskussion der erhaltenen Resultate.

Piperazin und Piperidin geben für x nahezu den Wert 1. Sie verhalten sich also auch bei dieser Reaktion wie sekundäre

aliphatische Amine. Daß Piperidin sich mit der Kohlensäure quantitativ zu einem neuen Körper — der Piperidincarbonsäure — vereinigt, merkt man schon während der Operation: bei längerem Einleiten von Kohlensäure in die erdalkalische Piperidinlösung verschwindet der markante Piperidingeruch vollständig.

Es war zu erwarten, daß Coniin als α -Propylpiperidin sich dem Piperidin analog verhalten würde. Wie aber ein Blick auf die Tabelle zeigt, gibt Coniin ein bedeutend kleineres Verhältnis $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$, im Mittel $\frac{1}{1,56}$; außerdem schwanken die Werte in weiten Grenzen. Worauf es beruht, daß Coniin bloß zu etwa $\frac{2}{3}$ reagiert, darüber wird sich erst nach Untersuchung anderer alkylierter Piperidine etwas Bestimmtes sagen lassen; möglicherweise liegt hier ein — durch die in α -Stellung zum Stickstoffatom befindliche Propylgruppe veranlaßter — Fall von sterischer Hinderung vor.

Das Tetrahydrochinolin  verhält sich in

seinen bekannten Reaktionen wie ein sekundäres fettaromatisches Amin. Nun sind allerdings einfache fettaromatische Amine, wie Methylanilin u. ä., noch nicht der Carbaminoreaktion unterworfen worden; aber nach den Resultaten, die M. Siegfried und C. Neumann beim Phenylglykokoll¹⁾ $\text{NH} \begin{matrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \text{CH}_2 - \text{COOH} \end{matrix}$ erhalten haben und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß beispielsweise Methylamin: $\text{NH}_2 - \text{CH}_3$ sich bei der Carbaminoreaktion ebenso verhält wie Aminoessigsäure: $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, ließ sich voraussehen, daß Tetrahydrochinolin nur zum geringsten Teile mit Kohlensäure in kalkalkalischer Lösung reagieren würde. Wie aus der Tabelle ersichtlich, reagiert das Tetrahydrochinolin bei der Carbaminoreaktion tatsächlich auch nur zu etwa $\frac{1}{4}$.

Mit diesen Ergebnissen steht im Einklang, daß beim Einleiten von Kohlensäure in die kalten kalkalkalischen Lösungen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 432.

sowohl von Coniin wie von Tetrahydrochinolin der charakteristische Geruch dieser Basen bestehen bleibt.

Indol, Skatol und Indigodisulfosäure bilden äußerst schwer lösliche Calciumcarbaminat: die aus dem Filtrat vom Kalkniederschlag nach dem Kochen erhaltenen Mengen von Calciumcarbonat und Stickstoff sind so gering, daß sich daraus kein einwandfreier Wert für x berechnen läßt. Aber der Umstand, daß beim Einleiten von Kohlensäure in die kalkalkalische Lösung des Skatols sein Geruch vollständig verschwindet, deutet darauf hin, daß wenigstens das Skatol quantitativ reagiert.

Ein Indolderivat, nämlich Indol- β -alanin, ist das Tryptophan, das bei der tryptischen Verdauung mancher Eiweißstoffe entsteht. Auch dieses wurde der Carbaminoreaktion unterworfen. Ferner wurde die Reaktion noch bei folgenden Eiweißspaltungsprodukten bzw. in physiologischer Hinsicht wichtigen Substanzen untersucht: dem Cystin, Isoserin, Glukosamin und Taurin. In der folgenden Tabelle gebe ich wieder eine Übersicht der Versuche und im Anschlusse daran werden die Resultate kurz besprochen.

	g CaCO ₃	ccm n/10-Säure	x	x im Mittel
Tryptophan: 0,22 g in 70 ccm Wasser	0,1247	19,3	1,56	
0,20 » » 80 » »	0,0800	11,2	1,40	1,55
0,20 » » 80 » »	0,0758	12,95	1,70	
Cystin: 0,11 g in 60 ccm Kalkwasser	0,0115	1,0	—	
Isoserin: 0,18 g in 70 ccm Wasser	0,0178	1,4	—	
Glukosamin: 0,3 g in 80 ccm Wasser	0,0524	5,0	0,95	
0,24 » » 80 » »	0,0424	4,4	1,04	0,99
Taurin: 0,13 g in 60 ccm Wasser	0,0918	8,8	0,96	
0,16 » » 70 » »	0,1076	9,7	0,90	0,93

Die Ausführung der Reaktion geschah nach der am Anfang dieser Arbeit gegebenen Vorschrift. Nur wurde im

allgemeinen die Zersetzung in Calciumcarbonat und Ausgangssubstanz durch kurzes Aufkochen bewirkt.

Tryptophan war von mir durch tryptische Verdauung von Fibrin — als Nebenprodukt gelegentlich der Darstellung der Trypsinfibrinpeptide — erhalten worden. Das Rohprodukt wurde durch Kochen mit frisch gefälltem Kupferoxyd in das in heißem Wasser unlösliche Kupfersalz übergeführt¹⁾; hieraus wurde das Tryptophan durch Zersetzen mit frischem Schwefelammonium auf dem Wasserbade und Konzentrieren des Filtrats vom Schwefelkupfer regeneriert. Nach dem Umkrystallisieren aus Wasser erwies es sich als vollkommen rein. Smp. 270° unkorrekt.

Zu den Analysen wurde bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1180 g Substanz gaben 0,2800 g CO₂ und 0,0664 g H₂O.

0,1107 » » verbrauchten 10,9 ccm n/10-Säure.

Gefunden: 64,71% C 6,25% H 13,78% N

Berechnet für C₁₁H₁₂N₂O₂: 64,70% » 5,88% » 13,72% »

Molekulargewichtsbestimmung des Tryptophans:

0,316 g Substanz erniedrigten den Gefrierpunkt von 10,0 g Wasser

Versuch I Versuch II

um 0,305° bzw. 0,293°, im Mittel um 0,299°.

Gefunden: M = 195,5

Berechnet für C₁₁H₁₂N₂O₂: » = 204

Anmerkung: Das Tryptophan ist nach dem Kjeldahlschen Verfahren äußerst schwer zu verbrennen, worauf bereits C. Neuberg und N. Popowsky²⁾ aufmerksam gemacht haben. Um eine quantitative Überführung seines Stickstoffs in Ammoniak zu erreichen, erhitzte ich das Tryptophan so lange mit Schwefelsäure, bis die Lösung ganz klar und bloß noch schwach gelblich war (6—7 Stunden), und fügte erst dann Kaliumpermanganat in mehreren kleinen Portionen zur Beendigung der Verbrennung hinzu.

Die beim Tryptophan für x erhaltenen Werte schwanken allerdings aus bisher nicht aufgeklärten Gründen etwas; immerhin läßt sich aus ihnen entnehmen, daß von den beiden Stickstoffatomen des Tryptophanmoleküles das des Alaninrestes quantitativ, das des Indolringes etwa zur Hälfte reagiert.

¹⁾ s. Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 213. (E. Abderhalden, Beitrag zur Kenntnis des Tryptophans und einiger seiner Derivate.)

²⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. II, S. 369.

Cystin war nach der Vorschrift von E. Fischer¹⁾ durch Zersetzen von Pferdehaar mit Salzsäure dargestellt und durch wiederholte Umkrystallisation aus ammoniakalischem Wasser — durch Abdunsten des Ammoniaks bei längerem Stehen an der Luft — gereinigt worden. Zersetzungspunkt: 257—260°.

Leider ist das cystincarbonsaure Calcium in Wasser äußerst schwer löslich; die gefundenen Mengen Calciumcarbonat und Stickstoff sind zur Berechnung eines einwandfreien Wertes x zu gering.

Auch die bei Anwendung der Carbaminreaktion auf Iso-serin erhaltenen Mengen Carbonat und Stickstoff gestatten nicht die Berechnung eines Wertes für x . Das Isoserin wurde — als eine verhältnismäßig leicht synthetisch darstellbare Oxyaminocarbonsäure — deshalb der Carbaminreaktion unterworfen, da in letzter Zeit Oxyaminocarbonsäuren unter den Spaltungsprodukten vieler Eiweißkörper aufgefunden sind. Die Feststellung des Wertes für x bei einer Oxyaminocarbonsäure schien aber von besonderem Interesse, nachdem M. Siegfried²⁾ gefunden hat, daß nicht nur Aminogruppen, sondern auch alkoholische Hydroxylgruppen bei Gegenwart von Erdalkali mit Kohlensäure reagieren.

Die Darstellung des Isoserins führte ich nach der Vorschrift von E. Fischer und H. Leuchs aus:³⁾ 23,5 g Epichlorhydrin gaben 13,2 g β -Chlormilchsäure. 12 g β -Chlormilchsäure lieferten 3,8 g Isoserin. Zersetzungspunkt: 255° unter heftiger Gasentwicklung.

Isoserin ist ziemlich leicht in Wasser und Kalkwasser löslich; andererseits geht aus der in der Tabelle angeführten Carbaminobestimmung hervor, daß das Calciumsalz des Einwirkungsproduktes von Kohlensäure auf Isoserin in Kalkwasser äußerst schwer löslich ist. Noch schwerer löslich dürfte das entsprechende Baryumsalz sein. Da nun beispielsweise beim Einleiten von Kohlensäure in eine auf 4° abgekühlte, wässe-

¹⁾ E. Fischer, Anleitung zur Darstellung organischer Präparate (1905), S. 89.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 428.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3794.

rige Lösung, die Glykokoll und Baryumhydroxyd in molekularen Mengen enthält, sich glykokollcarbonsaures Baryum bildet, so glaubte ich in analoger Weise das Baryumsalz des Einwirkungsproduktes von Kohlensäure auf Isoserin in fester Form darstellen zu können; statt dessen entstand aber bei mehreren in dieser Richtung unternommenen Versuchen bloß Baryumcarbonat, aus dessen Filtrat das Isoserin nahezu quantitativ regeneriert werden konnte. Hieraus geht hervor, daß Isoserin nur mittels eines großen Überschusses von Kohlensäure und Erdalkali — wie er bei der Carbaminobestimmung ja zur Anwendung kommt — in seine Carbonsäure überführbar ist.

Ein Mittelglied zwischen Oxyaminocarbonsäuren, wie Isoserin, und Hexosen bildet das Glukosamin, ein Aminozucker mit 6 Kohlenstoffatomen. Da, wie schon oben erwähnt, Oxyaminocarbonsäuren bei der Spaltung mancher Eiweißstoffe entstehen, so stellt das Glukosamin gewissermaßen eine Brücke zwischen Eiweiß und Kohlenhydraten dar.¹⁾ Das Glukosamin, das bei der Spaltung mancher Mucine und Eiweißstoffe erhalten worden ist, ist also eine Substanz von hoher, physiologischer Bedeutung.

Glukosamin war in Form seines salzsauren Salzes im hiesigen Laboratorium aus Chitin dargestellt und durch UmkrySTALLISIEREN aus verdünntem Alkohol gereinigt worden.

N-Bestimmung nach Kjeldahl: 0,2498 g bei 100° getrocknete Substanz verbrauchten 12,1 ccm n_{10} -Säure.

Gefunden: N = 6,78%. Berechnet für $C_6H_{14}O_6NCl$: N = 6,50%.

Wie die Tabelle zeigt, fand ich beim Glukosamin für x ziemlich genau den Wert 1. Da man unter Berücksichtigung der früheren Untersuchungen wohl annehmen darf, daß die Aminogruppe des Glukosamins quantitativ mit der Kohlensäure reagiert hat, so sind demnach seine Hydroxylgruppen unter den betreffenden Umständen nicht in Reaktion getreten.

Als letzte physiologisch interessante Substanz wurde das Taurin der Carbaminoreaktion unterworfen. Taurin ist zwar kein eigentliches Eiweißspaltungsprodukt; doch steht es in naher

¹⁾ Zitiert nach Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie, VI. Aufl., S. 120.

Beziehung zum Cystin, wodurch seine Abstammung aus Eiweiß bewiesen ist. In Verbindung mit Cholsäure — als Taurocholsäure — findet es sich in der Galle des Menschen und vieler Tiere. Zu meinen Versuchen benutzte ich ein aus Taurocholsäure dargestelltes, schön krystallisiertes Präparat aus der Sammlung des hiesigen Instituts.

Wie zu erwarten war, ergab die Carbaminoreaktion beim Taurin für x innerhalb der Fehlergrenzen den Wert 1: Die Aminogruppe des Taurins reagiert quantitativ mit einem Molekül Kohlensäure.

Ich erfülle eine angenehme Pflicht, indem ich zum Schlusse Herrn Prof. Dr. M. Siegfried für seine vielfache Unterstützung bei dieser Arbeit sowie seine wertvollen Ratschläge meinen herzlichsten Dank ausspreche.
