

Daß damit die von demselben Autor gegebene »chemische Erklärung für die (von Hantzsch) beobachtete Trimolekularität« auch binfällig ist, sei nur deshalb erwähnt, weil, wie ich später<sup>1)</sup> nachgewiesen habe, derartige Amoniums Salze in indifferenten Medien gar nicht polymerisiert, sondern nur verschieden stark assoziiert sind. Auch die dunkelfarbig (grünen und braunen) Acridonium-sulfite sollen nach Hrn. Kehrman nicht einheitliche Salze, sondern solche »chinhydronartiges« Doppelverbindungen sein — was ebenfalls nicht richtig ist, obgleich hier wenigstens bei ihrer Bildung aus Methyl-phenyl-acridol und schwefliger Säure durch die reduzierende Wirkung der letzteren, die Entstehung von Hydro-acridin nicht so prinzipiell ausgeschlossen wäre, wie bei den Jodiden. Aber auch hier gibt sich die Abwesenheit von Hydro-acridin-Salz dadurch zu erkennen, daß sich das Sulfid wie das Jodid in viel heißem Wasser neutral und völlig klar löst, und daraus wieder in fast schwarz erscheinenden Krystallen ausgeschieden wird — ohne daß sich Hydro-acridin nachweisen läßt.

Unhaltbar ist danach endlich auch die Annahme Kehrmanns, daß die Verschiedenfarbigkeit der Lösungen polychromer Salze je nach Aggregatzustand, Konzentration, Temperatur oder Natur des Lösungsmittels durch Gleichgewichte der normalen Salze mit den Hydro-Derivaten bedingt seien. Tatsächlich handelt es sich hierbei eben um Chromoisomere, d. i. um Valenzisomere, deren Lösungsgleichgewichte unter den erwähnten Bedingungen verschoben werden. Übrigens würde sich auch aus diesen von mir gelieferten, von Hrn. Kehrman leider nicht genügend beachteten Nachweisen noch auf verschiedene Weise dartun lassen, daß Kehrmanns Auffassung unhaltbar ist — worauf aber nach den obigen Ausführungen wohl verzichtet werden kann.

### 85. Walther Löb: Über das Verhalten des Formamids unter der Wirkung der stillen Entladung. Ein Beitrag zur Frage der Stickstoff-Assimilation.

[Aus der Chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.]  
(Eingegangen am 10. Febr. 1913; vorgetr. in der Sitzung am 9. Dezbr. 1912.)

In dem Problem der natürlichen Stickstoff-Assimilation interessiert besonders die Frage nach dem ersten organischen stickstoffhaltigen Produkt, das den Ausgangspunkt für die Bildung der Eiweißkörper darstellt. Man hat der Ansicht Ausdruck gegeben, daß der Aufbau der organischen Stickstoffverbindungen in der Natur durch eine Re-

<sup>1)</sup> B. 44, 1776 [1911].

aktion zwischen Ammoniak und einer der Stufen der Kohlensäure-Assimilation erfolgen könnte, wie etwa einem Kohlenhydrat der niederen Reihe bezw. Formaldehyd. Vielfach hat auch die Anschauung Anklage gefunden, daß der Eingriff des Stickstoffs erst bei einem höheren Gliede der Kohlenhydrat-Reihe stattfände oder auch auf eine Umsetzung des Ammoniaks mit Säuren, wie niederen Oxysäuren<sup>1)</sup>, zurückzuführen sei. Keiner dieser Anschauungen dienten irgendwelche genaueren experimentellen Befunde als Stützen. Während man über die Form, in der der Stickstoff der Luft und der anorganisch gebundene des Bodens in assimilationsfähige Verbindungen, wie Nitrate und Ammoniak, übergeht, ungefähr Klarheit hat gewinnen können, sind wir über die zweite Kardinalfrage, wie der anorganisch gebundene Stickstoff in die organisch gebundene Form übergeht, bisher auf Vermutungen angewiesen.

Einen Ansatz, tiefer in dieses Problem einzudringen, schienen die Versuche Berthelots<sup>2)</sup> über die Fixierung des Stickstoffs durch zahlreiche organische Verbindungen unter der Wirkung der stillen Entladung zu bringen. Berthelot selbst hielt eine solche Deutung seiner Versuche für möglich; jedoch ergibt eine genauere Betrachtung seiner Resultate und eine Nachprüfung seiner Versuche, daß eine derartige Verwertung seiner Ergebnisse nicht statthaft ist. Berthelot hat, wie ich an anderer Stelle schon ausführte<sup>3)</sup>, der Kompliziertheit der bei der Fixierung des Stickstoffs auftretenden Reaktionen nicht Rechnung getragen und einer Substanz die Fähigkeit, Stickstoff unter der Wirkung der stillen Entladung aufzunehmen, zugesprochen, wenn irgend ein Zersetzungsprodukt der Substanz, wie eine Säure oder ein Aldehyd, die Eigenschaft besaß, den zunächst in Ammoniak verwandelten Stickstoff zu binden. Eine Untersuchung der sich bildenden Substanzen verbot sich ihm durch die minimalen Ausbeuten, so daß Berthelot alle seine Schlüsse über Natur und Zusammensetzung der entstandenen Verbindungen lediglich aus den Gasanalysen berechnete. Es ist klar, daß diese Berechnungen nur dann zu brauchbaren Schlüssen führen können, wenn bei der Reaktion nur eine einzige einheitliche Verbindung entsteht. Das ist aber in keinem der von ihm untersuchten Reaktionen der Fall.

So sind die von ihm aufgestellten Formeln der komplizierten Verbindungen, die aus Säuren, Aldehyden, Aminosäuren und Kohlenhydraten entstehen sollen, für die Erkenntnis der sich abspielenden Vor-

<sup>1)</sup> Nach den Versuchen von Haas (Bio. Z. 46, 296 [1912]) ist im Tierkörper z. B. Glyoxylsäure nicht als Durchgangsstufe bei der Bildung des Glykokolls anzusehen.

<sup>2)</sup> C. r. 126, 616 [1898] u. a. a. O.      <sup>3)</sup> Bio. Z. 20, 136 [1909].

gänge völlig wertlos. Z. B. habe ich bei der Nachprüfung des Berthelotschen Versuches über die Fixierung des Stickstoffs durch Alkohol<sup>1)</sup> unter dem Einfluß der Entladung, bei dem Berthelot die Entstehung von Verbindungen der Zusammensetzung  $[C_2H(OH)NH_2]_2$ , aus den Gasanalysen gefolgert hat, gefunden, daß das Reaktionsprodukt der Hauptsache nach aus Ameisensaurem Ammonium und Hexamethylen-tetramin besteht.

Es war deshalb nötig, bei der Bearbeitung dieses Gebietes von Anfang anzufangen und den Hauptwert der Untersuchung auf den chemischen Nachweis der entstehenden Stoffe zu legen, ohne die Gasanalysen als Ersatz einer chemischen Untersuchung der Reaktionsprodukte gelten zu lassen. Nachdem ich in früheren Versuchen<sup>2)</sup> in Bestätigung älterer Angaben gefunden hatte, daß feuchter Stickstoff bereits Ammoniak liefert, bei allen meinen Versuchen aber das Wasser als integrierender Bestandteil hinzugezogen wurde, konnte ich die experimentelle Aufgabe dahin vereinfachen, daß als stickstoffhaltige Komponente stets feuchtes Ammoniak gewählt wurde.

Durch meine Versuche über das Verhalten der feuchten Kohlensäure unter dem Einfluß der Entladung hatte ich festgestellt<sup>3)</sup>, daß unter Reduktion der Kohlensäure und gleichzeitiger Spaltung des Wassers zuerst Formaldehyd, dann Glykolaldehyd entsteht, der mit großer Leichtigkeit in Hexosen übergeht. Es lag nun nahe, daran zu denken, daß der Glykolaldehyd durch Oxydation in Glykolsäure übergeht, die mit Ammoniak unter Bildung von Glykokoll bei der Energiezufuhr durch die stille Entladung reagiert. Nach dieser Richtung bewegten sich auch meine ersten, durch Jahre fortgesetzten Versuche, aber mit negativem Erfolg. Ich erhielt bei verschiedenen, in Frage kommenden Kombinationen, wie feuchter Kohlensäure, feuchtem Kohlenoxyd, Alkohol usw. und Ammoniak mit und ohne Sauerstoff oder Luft stets als das einzige für das Stickstoff-Assimilations-Problem in Frage kommende Produkt das Reaktionsprodukt von Formaldehyd und Ammoniak, das Hexamethylen-tetramin. Das daneben entstehende Ameisensaure Ammonium schied als eine Substanz, die an der Synthese des Eiweißes beteiligt sein könnte, ohne weiteres aus. Die Leichtigkeit und Regelmäßigkeit der Entstehung des Hexamethylen-tetramins führte mich schließlich zu der Annahme, daß in diesem eine erste mögliche Phase der Stickstoff-Assimilation zu sehen sei, und ich legte demgemäß den Schwerpunkt der weiteren Untersuchung zunächst darauf, diese Stellung der genannten Substanz experimentell zu be-

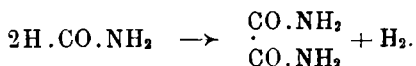
<sup>1)</sup> Bio. Z. 20, 137 [1909].

<sup>2)</sup> Z. El. Ch. 14, 556 [1908].

<sup>3)</sup> Z. El. Ch. 12, 282 [1906].

gründen, d. h. eine Beziehung von ihr zu den Aminosäuren zu finden. Diese Versuche, die sich chemisch auf das Verhalten des Hexamethylentetramins gegenüber Reduktions- und Oxydationsmitteln unter den verschiedensten Bedingungen, biologisch auf eine Untersuchung der Substanz auf ihre Assimilationsfähigkeit oder Ausnutzbarkeit durch lebende Hefe bezogen, verliefen absolut negativ, so daß ich allmählich von meiner Ansicht, daß das Hexamethylentetramin eine direkte Rolle bei der Stickstoff-Assimilation spielen könne, wieder zurückkam.

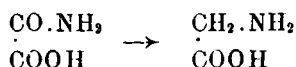
Nach diesen Fehlversuchen blieb noch eine Möglichkeit, von den ersten, einfachsten in Frage stehenden anorganischen Substanzen zu den Aminosäuren zu gelangen, nämlich über die schon von Losanitsch und Jovitschitsch<sup>1)</sup> beobachtete Reaktion zwischen Ammoniak und Kohlenoxyd oder, was für die Entladungsreaktionen, die in Gegenwart von Kohlensäure aus dieser stets Kohlenoxyd erzeugen, dasselbe ist, Kohlensäure zu Formamid. Freilich konnte bei meinen stets in Gegenwart von Wasser durchgeführten Versuchen die Bildung des Formamids, die nur bei der Reaktion der trocknen Gase unter der Wirkung der Entladung beobachtet worden war, nicht erwartet werden; jedoch bestand die Möglichkeit, daß trotz der Gegenwart des Wassers eine weitere Synthese das intermediär entstehende Formamid als Zwischenphase benutzt. Da ich bei meinen ersten Versuchen in dieser Richtung unter Verwendung von feuchtem Kohlenoxyd und Ammoniak nur Hexamethylentetramin isolieren konnte, wählte ich das Formamid selbst als Ausgangsmaterial. Die Entladung wirkt wesentlich nur auf Dämpfe; deshalb wurden die Versuche, wegen der Zersetzlichkeit des siedenden Formamids bei gewöhnlichem Druck, im Vakuum durchgeführt. Das Resultat des Versuchs war ein sehr überraschendes. Die Wandungen des Entladungsrohres bedeckten sich alsbald mit einer weißen krystallinischen Substanz, die als Oxamid erkannt wurde. Während der Entladung spaltet sich Wasserstoff ab. Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Die Tatsache, daß Oxamid beim Kochen mit Wasser oder Ammoniak zum kleinen Teil in oxaminsaures Ammonium übergeht, veranlaßte mich, wäßrige Formamidlösungen — gleichfalls im Vakuum — der Wirkung der Entladung auszusetzen. Wieder beobachtet man während des Versuchs die Abscheidung einer weißen krystallinischen Substanz auf den Wandungen des Elektrisators. Sie besteht

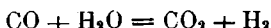
<sup>1)</sup> B. 30, 135 [1897].

der Hauptsache nach aus oxaminsaurem Ammonium, dem bei sehr lange durchgeführten Versuchen etwas Ammoniumoxalat beigegeben ist. Oxamid entsteht hierbei nicht. Die Oxaminsäure steht nun mit dem Glykokoll, der einfachsten Aminosäure, in nächstem Zusammenhang. Wenn es gelingt, die Reduktion:



durchzuführen, so war eine Synthese des Glykokolls gegeben, die auf direktem Wege von Kohlensäure und Ammoniak zu einem zweifellos auch in den natürlichen Prozessen bedeutungsvollen Stickstoff-Assimilationsprodukt führt.

Aus meinen Versuchen über die künstliche Kohlensäure-Assimilation mittels der Entladung ging hervor, daß das Wasser selbst als starkes Reduktionsmittel wirksam sein kann. Aus feuchtem Kohlenoxyd entsteht, wenn auch in geringer Menge, Methan<sup>1)</sup>; feuchte Kohlensäure wird zu Formaldehyd reduziert. Das Wasser zerfällt selbst zum kleinen Teil in Wasserstoff und Sauerstoff<sup>2)</sup>. Ferner ist die Reaktion:



für die Reduktionswirkung des Wassers in Gegenwart von Kohlenoxyd zu berücksichtigen. Auch für sie liegen bei der Einwirkung der Entladung auf feuchtes Formamid die Verhältnisse günstig, weil das Formamid zum Teil stets der Umkehrung seiner Bildungsreaktion unterliegt:



so daß das wasserstoff-liefernde Kohlenoxyd zugegen ist.

Auf Grund dieser Tatsachen erschien es möglich, daß eine wäßrige Formamidlösung unter dem Einfluß der Entladung sofort Glykokoll liefert.

Die Untersuchung ergab mit voller Sicherheit die Bildung einer Aminosäure, freilich in äußerst geringfügiger Ausbeute. Trotzdem aber ließ sich der Nachweis ihrer Gegenwart durch eine Reihe eindeutiger Reaktionen führen. Diese Reaktionen, die nach vollständiger Entfernung des Ammoniaks angestellt wurden, sind erstens die Titration des Aminosäuren-Stickstoffs nach der Formaldehyd-Methode von Sørensen<sup>3)</sup>, zweitens die Abspaltung des Aminosäuren-Stickstoffs nach der Methode von van Slyke<sup>4)</sup>, drittens die Reaktion mit Triketo-

<sup>1)</sup> Z. El. Ch. 12, 296 [1906]. <sup>2)</sup> v. Hofmann, B. 23, 3317 [1900] und l.c.

<sup>3)</sup> Bio. Z. 7, 45 [1907] und a. a. St. ibid. 25, 1 [1910].

<sup>4)</sup> Journ. of Biolog. Chemistry 12, 275 [1912].

hydrindenhydrat nach Ruhemann-Abderhalden<sup>1)</sup> und schließlich die Darstellung der Naphthalinsulfoverbindung nach E. Fischer und Bergell<sup>2)</sup>. Wenn es mir bisher auch noch nicht gelungen ist, eine Analyse durchzuführen, so glaube ich doch, daß die Übereinstimmung des Sinterungspunktes (148° statt 151°) und der Krystallform der Naphthalinsulfo-Verbindung mit den Eigenschaften der entsprechenden Glykokollverbindung zusammen mit den aus der Reaktion selbst hervorgehenden chemischen Gesichtspunkten und den anderen Aminosäure-Reaktionen zu dem Schluß berechtigen, daß die entstandene Aminosäure Glykokoll ist.

Zunächst spricht die Gegenwart der Oxaminsäure selbst entscheidend dafür, daß eine bei der gleichen Reaktion unter Reduktionsbedingungen entstehende Aminosäure nur das Reduktionsprodukt der Oxaminsäure selbst sein kann. Ferner konnte ich gegenüber den eben genannten Aminosäure-Reaktionen an einer 0.01-prozentigen Glykokoll-Lösung keinen Unterschied gegenüber der vom Ammoniak befreiten neutralisierten Versuchslösung konstatieren.

Schließlich scheint mir noch ein Umstand, auf den ich bei Behandlung der Frage des Zuckeraufbaus und -abbaus auf Grund experimenteller Ergebnisse mehrfach hingewiesen habe<sup>3)</sup>, für die Auffassung der Reaktion von besonderer Bedeutung zu sein; das ist die Tatsache, daß die unter gleichen Reaktionsbedingungen verlaufenden Aufbau- und Abbau-Reaktionen oft chemische Umkehrungen darstellen.

Da die Bildung des Glykokolls aus Kohlensäure und Ammoniak ein Reduktionsprozeß ist, so muß die Umkehrung eine Oxydation des Glykokolls zu Kohlensäure und Wasser bzw. zu einer Zwischenphase dieser Endprodukte sein. Nun ist bekannt, daß viele Eiweißstoffe und ihre hydrolytischen Spaltprodukte, vornehmlich Aminosäuren, bei ihrer Oxydation Oxaminsäure und Formamid bilden. Im besonderen haben Kutscher und Schenk<sup>4)</sup> aus Gelatine mit Calciumpermanganat oxaminsaures Ammonium gewonnen, als dessen Muttersubstanz sie das Glykokoll ansprechen. Vor allem aber hat Halsey<sup>5)</sup>, als er das Glykokoll mit Permanganat zur Aufklärung der Harnstoff-Bildung behandelte, gefunden, daß Glykokoll nicht nur Harnstoffbildner ist, sondern als Zwischenprodukte Formamid und Oxaminsäure liefert. Im Gegensatz hierzu ist Hexamethylenetetramin kein Harnstoffbildner und gibt auch keine der beiden Substanzen.

<sup>1)</sup> Soc. 97, 2025 [1910]; H. 72, 37 [1911].

<sup>2)</sup> B. 35, 3779 [1902].

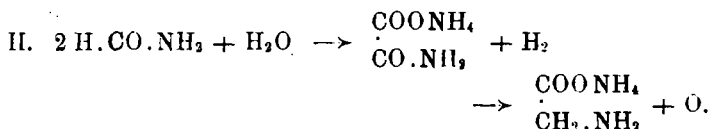
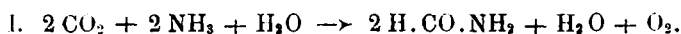
<sup>3)</sup> Siehe z. B. Bio. Z. 23, 10 [1909].

<sup>4)</sup> B. 37, 2928 [1904].

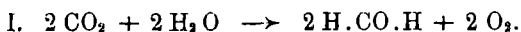
<sup>5)</sup> H. 25, 325 [1898].

Ich glaube also aus meinen Versuchen, die weiter fortgesetzt und ausgebaut werden, den Schluß ziehen zu dürfen, daß die unter dem Einfluß der Entladung erreichte künstliche Stickstoff-Assimilation als ein möglicher Weg auch des natürlichen Prozesses zu betrachten ist. Beiläufig will ich hier nur erwähnen, daß ich nach den Resultaten mit dem Formamid wieder auf die ursprüngliche Kombination: feuchtes Kohlenoxyd und Ammoniak zurückgegangen bin und auch hier das Auftreten einer Aminosäure mit den oben genannten Reaktionen konstatiert habe.

Formuliert man die Reaktionen unter Wahl von Kohlensäure, Wasser und Ammoniak als Ausgangsprodukte, so erhält man folgendes Bild:



Der Vorgang dieser Stickstoff-Assimilation präsentiert sich demnach in den ersten Phasen qualitativ als ein Parallelvorgang der Kohlensäure-Assimilation:



In beiden Prozessen handelt es sich um eine Kohlensäure-Aufnahme und Sauerstoff-Abgabe.

Inwieweit die beobachteten Reaktionen zur Aufklärung biologischer Vorgänge dienen können, soll später an Hand des erweiterten Versuchsmaterials dargestellt werden. Nur über die Beziehung der Versuchsbedingungen zu den natürlichen Bedingungen sei hier das Folgende ausgeführt.

Die endothermen Reaktionen, zu denen diese organischen Synthesen gehören, können sich nur unter Energieaufnahme vollziehen. Die natürliche Energiequelle ist die Sonnenstrahlung und elektrische Energien, die durch Ausbildung von Potentialdifferenzen geschaffen werden. Es ist bekannt, daß in den Pflanzen die Assimilations-Reaktionen in den grünen Teilen am stärksten durch die gelben und roten Strahlen ausgelöst werden, die allgemein die chemisch unwirksamsten sind, während die chemisch am stärksten wirksamen ultraviolett Strahlen jedenfalls wegen ihrer starken Absorption durch die Atmosphäre nur in untergeordneter Menge bis zur Erdoberfläche dringen. Bei dem künstlichen Versuch aber ist zu bedenken, daß den Pflanzen das Chlorophyll als Sensibilisator für die gelben und roten Strahlen dient und diesen die chemischen Eigenschaften der

ultravioletten gibt. Bei dem Verzicht auf den Sensibilisator erscheint demnach die Anwendung der ultravioletten Strahlung als geboten und eine Nutzanwendung der mit ihr erzielten künstlichen Lichtreaktionen auf die natürlichen durchaus statthaft.

Diese ultraviolette Strahlung stellt nun der stille Entladungsvorgang reichlich zur Verfügung. Ob die Strahlung der einzige Faktor der beschriebenen Entladungsvorgänge ist, wie es Warburg<sup>1)</sup> für die Ozonbildung nachgewiesen hat, oder ob die elektrische Energie als solche mitwirkt, ist noch nicht festgestellt; jedenfalls bringt die Gegenwart der elektrischen Energie in die künstlichen Versuchsbedingungen gegenüber den natürlichen Bedingungen, in denen elektrische Potentialdifferenzen stets vorhanden sind, nichts qualitativ fremdes. Es ist möglich, durch Anwendung einer ultravioletten Strahlungsquelle direkt alle die Entladungs-Reaktionen, die auf der Wirkung der durch die Entladung erzeugten ultravioletten Strahlen beruhen, hervorzurufen. In der Tat haben die mannigfachen Versuche<sup>2)</sup> der letzten Jahre mit der Quecksilber-Quarzlampe durchgängig bei den vergleichbaren Reaktionen qualitativ dieselben Resultate ergeben, die ich durch die Anwendung der dunklen Entladung erhalten hatte.

### Experimenteller Teil.

#### I. Die Wirkung der stillen Entladung auf wasserfreies Formamid.

20 g Formamid werden in einem kleinen Rundkolben, der in der früher geschilderten Anordnung an den mit Rückflußkühler versehenen Elektrisator angeschlossen ist, bei einem Druck von 15 mm Quecksilber in einem Ölbad von 130° im Sieden gehalten<sup>3)</sup>. Die Pumpe ist an den Rückflußkühler angeschlossen. Als flüssige Elektroden bewähren sich, da wäßrige Lösungen wegen der 100° überschreitenden Temperatur nicht anwendbar sind, Mischungen von 90 Tln. reinem Glycerin mit 10 Tln. 10-prozentiger Chlorcalciumlösung.

Die Stromverhältnisse waren bei allen Versuchen so gewählt, daß der Motor des Rotax-Unterbrechers auf maximale Geschwindigkeit und die Unterbrechungszahl auf das Maximum eingestellt waren.

<sup>1)</sup> W. [4] 13, 464 [1903].

<sup>2)</sup> z. B. Berthelot und Gaudechon, C. r. 150, 1169, 1327, 1690 (Bild. von Formamid aus CO u. NH<sub>3</sub>) [1910]. Pfibram und Francke, Sitz.-Ber. d. Wien. Akad., Mathem.-naturwiss. Klasse 121. Febr. 1912.

<sup>3)</sup> Reines Formamid siedet unter 15 mm Druck bei 110°. Die Angabe im Beilstein: Siedepunkt im Vakuum bei 150° bezieht sich also auf höhere Drucke.

Die Stromstärke der Primärspule des 25 cm-Funkeninduktors betrug 1–1.5 Amp. Ein Unterschied in den Versuchsergebnissen wurde innerhalb dieser Intensitätsschwankung nicht bemerkt.

Nach mehrstündiger Einwirkung der Entladung auf die Formamiddämpfe beginnt die sichtbare Abscheidung einer weißen Substanz auf den Elektrisorwandungen, die bei dem weiteren Fortgang des Versuches zum Teil von dem zurückfließenden Formamid in den Siedekolben gespült wird und dort ungelöst bleibt. Ein Funkendurchgang findet bei den gewählten Bedingungen nicht statt; der Elektrisor erstrahlt in einem schwachen, nur im Dunkeln sichtbaren, violetten Licht. Durch besondere Versuche, die an anderer Stelle geschildert werden, ist nachgewiesen, daß eine durch etwaige Funkenbildung veranlaßte pyroge Zersetzung des Formamids ganz anders verläuft, als die Wirkung der stillen Entladung und keine Säuren der Oxalsäure Reihe liefert. Nach 22-stündiger Versuchsdauer war der Elektrisor durch die weiße Substanz, die aus mikroskopischen Kryställchen bestand, undurchsichtig geworden, während das nur schwach gelb gefärbte Formamid im Siedekolben wenig etwas gefärbte Substanz enthielt. Der Versuch wurde meist nach dieser Dauer unterbrochen und schließlich in folgender Weise bearbeitet.

Nach der Trennung des Siedekolbens und des Kühlers vom Entladungsrohr wurde dieses mit Wasser nach Verschuß der beiden Öffnungen und nach dem Abgießen der Elektrodenflüssigkeiten so lange geschüttelt, bis der an den Wandungen sitzende Belag sich losgelöst hatte. Die Flüssigkeit wurde mit dem Inhalt des Siedekolbens vereint und die Ausschüttelung mehrfach wiederholt.

Es hatte sich gezeigt, daß bei direkter Destillation des filtrierten ursprünglichen Kolbeninhalts im Vakuum bei 115° nur Formamid überging und nur ganz geringe Mengen gelöster Substanz zurückblieben. Die wäßrige Formamidlösung mit dem in ihr befindlichen Niederschlag wurde nach längerer Abkühlung filtriert, der Niederschlag mit Wasser, Alkohol und Äther gründlich ausgewaschen. Er war sogleich weiß und krystallinisch; sein Schmelzpunkt lag oberhalb des Siedepunktes der konzentrierten Schwefelsäure. Beim Kochen mit Alkalien ging die Substanz unter Ammoniakabspaltung in Lösung. Die mit Essigsäure angesäuerte Flüssigkeit gab mit Calciumchlorid einen Niederschlag von oxalsaurem Calcium, bei Reduktion mit Natriumalgam entstand Glyoxylsäure, die durch die Adamkiewitzsche Eiweiß- und die Naphthoresorcin-Reaktion nachgewiesen wurde. Die durch das ganze Verhalten der Substanz nahegelegte Vermutung, daß Oxamid vorlag, wurde durch die Analyse bestätigt.

0.0538 g ergaben nach Kjeldahls Ammoniakbestimmung einen Verbrauch von 12.1 ccm  $\frac{1}{10}$ -n.  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0.0169 \text{ g N}$ .

$(\text{CO} \cdot \text{NH}_2)_2$ . Ber. N 31.8. Gef. N 31.4.

Beim Erhitzen der Substanz mit wäßrigem Ammoniak trat nach längerer Zeit Lösung ein. Beim Erkalten schied sich oxaminsaures

Ammonium, häufig in kleinen, kugelförmigen, an Tyrosin (beim spontanen Auskrystallisieren aus physiologischen Flüssigkeiten) erinnernden Krystallen, aus. Beim Ansäuern der Lösung des Salzes schieden sich nach einiger Zeit kleine Kryställchen aus, die durch ihren Schmp.  $210^{\circ}$ , ihre Umwandlung in Oxalsäure unter Ammoniakabspaltung sowie durch die Reduktion zu Glyoxylsäure leicht als Oxaminsäure identifiziert werden konnten.

Die Ausbeute, die ein 20-stündiger Versuch lieferte, beträgt  $0.05-0.08$  g Oxamid. Im allgemeinen wurde die Ausbeutebestimmung durch Umwandlung des Oxamids in oxalsaures Calcium und durch Calciumoxydwägung kontrolliert. Die Werte entsprechen einander so nahe, daß sich kein Anhaltspunkt für die Entstehung einer anderen festen Substanz neben Oxamid ergab.

Durch das Arbeiten im Vakuum war die Untersuchung der entweichenden Gase bei diesem langandauernden Versuche — da der Apparat durchschnittlich nur 3 Stunden am Tage in Tätigkeit blieb, erforderte ein 20-stündiger Versuch rund eine Woche — etwas unbequem. Es wurde in der Weise verfahren, daß in die Vakuumleitung ein Azotometer so eingeschaltet wurde, daß das untere Gaseintrittsrohr mit dem Rückflußkühler des Elektrisators, die obere Öffnung mit der Vakuumpumpe in Verbindung war, während das Wasser des Niveaugefäßes durch Verschuß des Schlauches mit einem Quetschhahn abgesperrt blieb. Nach Eintritt eines Vakuums wurde ein wenig Wasser in das Azotometer aus dem Niveaugefäß gelassen, so daß die abgespaltenen Gase von unten her das Wasser passierten. Von Zeit zu Zeit wurde der vom Rückflußkühler zum Azometer führende Schlauch abgeklemmt, das Azotometer geschlossen, Wasser aus dem Niveaugefäß einströmen gelassen und das vorhandene Gas in eine Hempelsche Gasbürette übergeführt. Nachdem auf diese Weise etwa 30 ccm gewonnen waren, wurden sie analysiert. Eine quantitative Bestimmung der Gasmenge ist natürlich in dieser einfachen Anordnung nicht möglich.

Für den vorliegenden Zweck genügte der qualitative Nachweis, daß das Gas zum größeren Teil aus Kohlenoxyd — etwa  $\frac{2}{3}$  der Gasmenge —, zum kleineren Teil aus Wasserstoff und Spuren Luft bestand. Das Azotometerwasser reagierte alkalisch und enthielt Ammoniak. Außer der zum Oxamid führenden Wasserstoffabspaltung wird also ein Teil des Formamids in Umkehrung seiner Bildungsreaktion durch die stille Entladung wieder in seine Komponenten Ammoniak und Kohlenoxyd gespalten. Die Prüfung des Kolbeninhalts nach dem Verdünnen mit Wasser und des an dem Elektrisator haftenden Oxamids auf Aminosäuren verlief absolut negativ.

## II. Die Wirkung der stillen Entladung auf wäßrige Formamidlösungen.

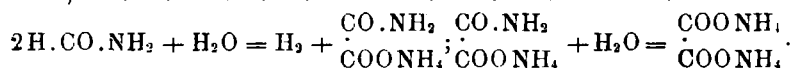
Die Versuche mit wäßrigen, 5–10-prozentigen Formamidlösungen wurden in der gleichen Anordnung, wie die mit wasserfreiem Form-

amid ausgeführt. Nur mußte das Ölbad durch ein Wasserbad, dessen Temperatur auf 40° gehalten wurde, ersetzt werden. Bei dieser Temperatur ist das Formamid im Vakuum genügend flüchtig und beständig, um der Wirkung der stillen Entladung im Elektrisator zugänglich zu sein. Das äußere Bild des Versuchsablaufs ähnelt dem am wasserfreien Formamid beobachteten.

Die Wandungen des Elektrisators bedecken sich im Laufe einiger Stunden mit einer festhaftenden weißen krystallinischen Substanz, die zwar zum Teil in den Siedekolben gespült wird, aber doch bewirkt, daß nach 18–20-stündiger Versuchsdauer der Elektrisator vollständig undurchsichtig geworden ist. Bei gleicher Behandlung des Elektrisators, wie sie bei den zuerst geschilderten Versuchen geübt wurde, zeigte sich aber, daß die Substanz in heißem Wasser vollkommen, wenn auch ziemlich schwer löslich ist. Beim Abkühlen oder Einengen trat erneute Krystallisation ein, deren Aussehen unter dem Mikroskop bereits auf oxaminsaures Ammonium hinwies. Daneben war aber in geringer Menge noch eine zweite Substanz entstanden, höchstwahrscheinlich oxalsaures Ammonium. Denn die gesamte Reaktionslösung gab nach Auflösen des Niederschlages, der zum Teil im Kolbeninhalt nach Beendigung des Versuchs suspendiert war, zum Teil erst von dem Elektrisator abgespült worden war, mit Calciumchlorid und Ammoniak eine geringe Abscheidung von oxalsaurem Calcium, die beträchtlich verstärkt wurde, nachdem die Lösung mit Natronlauge vom Ammoniak befreit und somit eine Umwandlung der Oxaminsäure in Oxalsäure herbeigeführt war.

Der Nachweis des oxaminsauren Ammoniums geschah wieder durch Umwandlung in freie Oxaminsäure, die aber nicht ganz rein gewonnen wurde, weil stets etwas saures Ammoniumoxalat sich mit ausschied. Auch die Reduktionsreaktion zu Glyoxylsäure wurde zur Kontrolle angestellt. Auf eine Analyse wurde nach einigen Versuchen verzichtet; es gelang nicht, das Ammoniumoxalat, von dem einmal mehr, einmal weniger beigemischt war, zu entfernen. Jedoch ließ sich der Nachweis der Oxaminsäure in der Weise mit Sicherheit führen, daß aus der warmen, schwach ammoniakalischen Lösung mit Calciumchlorid die vorhandene Oxalsäure ausgefällt wurde. Nach der Filtration und längerem Kochen mit Natronlauge entstand beim Ansäuern mit Essigsäure aufs neue ein nunmehr reichlicherer Niederschlag von oxalsaurem Calcium.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde zur quantitativen Ausbeutebestimmung oxalsaures und oxaminsaures Salz nach dem Kochen mit Natronlauge in oxalsaures Calcium übergeführt, dieses gewogen und seine Reinheit durch Calciumbestimmung kontrolliert. Für die Reaktion selbst spielt das oxalsäure Salz sicher nur eine sekundäre Rolle, indem es aus dem oxaminsauren Salz erst entstanden ist:



Die Entstehung der Oxaminsäure, deren Menge die des Oxamids aus wasserfreiem Formamid etwas übertrifft, legte es aus den in dem theoretischen Teil erwähnten Gründen nahe, die Reaktionsflüssigkeit auf ihren Gehalt an Aminosäure zu prüfen.

Die Reaktionsflüssigkeit ist nach Abbruch des Versuches neutral. Mit Triketohydrinden-hydrat gibt sie beim Kochen die für Aminosäuren charakteristische Violettblaufärbung, deren Intensität etwa der mit einer 0.01-prozentigen Glykokollösung erzielten entspricht. Diesen geringen Konzentrationen mußten die weiteren Aminosäure-Pröben, die Sörensensche und die van Slykesche, angepaßt werden.

Zu ihrer Ausführung wurde die Reaktionsflüssigkeit eines 20-stündigen Versuches in der folgenden Weise bearbeitet. Zu dem Inhalt des Kolbens wurde die mit warmem Wasser hergestellte Lösung der an den Wandungen des Elektrisators befindlichen festen Substanz hinzugegeben. Die Gesamtflüssigkeit wurde nunmehr mit Natronlauge gekocht, bis jede Spur Ammoniak ausgetrieben war, was durch die Gegenwart von unangegriffenem Formamid einige Zeit beansprucht. Sodann wurde mit Salzsäure gegen Lackmus genau neutralisiert und zunächst auf 150 cem eingedampft. Von dieser Lösung dienten 50 cem der Bestimmung der Oxalsäure durch Fällung mit Chlorcalcium in schwach essigsaurer oder ammoniakalischer Lösung. Die so ermittelte Ausbeute betrug für einen 20-stündigen Versuch 0.10—0.125 g Calciumoxalat, dessen Calciumgehalt zu 31.7% (Theorie 31.25%) festgestellt wurde, d. h. maximal 0.1 g oxaminsaures Ammonium. Ich möchte hier die Bemerkung einflechten, daß sich die Ausbeuten zweifellos durch Abänderung der Apparatur, größere Dimensionen, andere elektrische Verhältnisse usw. verbessern lassen werden. Dieser präparative Zweck blieb bei der vorliegenden Untersuchung im Hintergrund, da auch die erzielten kleinen Ausbeuten sich als genügend erwiesen, den Reaktionsgang mit Sicherheit festzustellen.

Die restierenden 100 cem der neutralen Lösung wurden geteilt und beide Hälften auf etwa 8 cem eingedampft. Zur Sörensenschen Bestimmung wurde nun so verfahren, daß die eine Hälfte mit 1 Tropfen 0.2-prozentiger Phenolphthaleinlösung versetzt und  $\frac{1}{10}$ -n. NaOH hinzugegeben wurde, bis gerade Rosafärbung gegen weißen Hintergrund eintrat. Sodann wurde mit einigen Tropfen  $\frac{1}{10}$ -n.  $H_2SO_4$  entfärbt und zur Entfernung der Kohlensäure einige Zeit gekocht, sodann wieder mit einigen Tropfen  $\frac{1}{10}$ -n. NaOH die Rosafärbung hervorgerufen und schnell auf Zimmertemperatur abgekühlt. Brachte man nun eine neutrale, von Kohlensäure in gleicher Weise befreite und unter Zusatz von Phenolphthalein durch  $\frac{1}{10}$ -n. NaOH gleichfalls auf Rosa eingestellte Formaldehydlösung hinzu, so trat momentane Entfärbung ein. Sogleich wurde nun mit  $\frac{1}{100}$ -n. NaOH wieder bis zum Auftreten der Rosafärbung titriert und aus der verbrauchten Lauge der Aminosäuren-Stickstoff berechnet. Es ergaben sich bei den einzelnen Versuchen schwankende, jedoch

nahe bei einander liegende Ausbeuten, die einen Verbrauch von 8—15 cem  $\frac{1}{100}$ -n. Natronlauge hervorriefen. Durch Kontrollversuche überzeugte ich mich häufig, daß bei Fehlen einer Aminosäure niemals eine Entfärbung beim Zusammenbringen der beiden rosa gefärbten Lösungen nach entsprechender Vorbehandlung eintrat, wobei zunächst zugesetzte Ammoniumsalze und Formamid in der beschriebenen Weise vom Ammoniak befreit wurden.

Überhaupt mußte den Kontrollversuchen besondere Bedeutung zugemessen werden. So überzeugte ich mich, daß neutrale Ammoniumsalze, Formamid, Hexamethylen-tetramin, Harnstoff, Oxaminsäure, cyanursäure Salze usw. mit Triketohydrinden-hydrat keinerlei Färbung ergaben, so daß die Angabe Abderhaldens<sup>1)</sup> über die Notwendigkeit mindestens einer Amino- und einer Carboxylgruppe für den Eintritt der Reaktion wohl zu Recht bestehen mag. Ferner wurden alle, auch weiter unten beschriebenen Reaktionen mit einer 0.01-prozentigen Glykokoll-Lösung ausgeführt und, da diese Konzentration etwa der im Versuche entstandenen entsprach, ein ganz gleiches Verhalten gegen Triketohydrinden-hydrat gegenüber der Sørensen'schen, der van Slykeschen und der Naphthalinsulfochlorid-Probe konstatiert.

Ein Verbrauch von 15 cem  $\frac{1}{100}$ -n. Natronlauge entspricht 0.0021 g Aminosäuren-Stickstoff, d. h. etwa 0.01 g Glykokoll.

Die zweiten 8 cem wurden mit Essigsäure auf 10 cem gebracht und in dem von van Slyke<sup>2)</sup> beschriebenen, vorzüglichen Apparat auf ihren Gehalt an Aminosäuren-Stickstoff geprüft. Kontrollversuche ergaben, daß es bei vorsichtiger Arbeit gelingt, die Luft bis auf 0.1 cem zu entfernen. Bei dem Versuch, der nur 0.0021 g Aminosäuren-Stickstoff nach Sørensen ergeben hatte, lieferte van Slykes Apparat 1.2 cem Gesamt-Stickstoff, d. h. 0.6 cem Aminosäuren-Stickstoff für die aus 50 cem der Reaktionslösung hergestellten 10 cem. In den ursprünglichen 150 cem waren also 1.8 cem = 0.00225 g Aminosäuren-Stickstoff, d. h. es fand eine nahe Übereinstimmung mit dem nach Sørensen ermittelten Werte statt. Als quantitative Stickstoffbestimmung zur Ermittlung des N-Gehaltes in der aus den Sørensen'schen Daten berechneten Glykokollmenge ist leider die van Slykesche Methode nicht brauchbar, weil sie gerade für Glykokoll nicht die genauen theoretischen Werte liefert, wie van Slyke<sup>2)</sup> selbst bereits festgestellt hat.

Der geschilderte Versuch entspricht den mittleren Ausbeuten. Die höchste wurde in einem 18-stündigen Versuche mit 0.05 g als Glykokoll berechneter Aminosäure erzielt.

Bei der geringen Menge der Aminosäure mußten zur Herstellung der Naphthalinsulfo-Verbindung besondere Versuche angestellt und lediglich auf sie verarbeitet werden. Dieselben — es sind 5 derartige

<sup>1)</sup> H. 72, 37 [1911].    <sup>2)</sup> Journ. of Biolog. Chemistry 12, 275 [1912].

<sup>3)</sup> ibid. 12, 286 [1912].

Versuche durchgeführt worden — verliefen stets in der gleichen Weise.

Die Reaktionslösung wurde zunächst durch Kochen mit Natronlauge vom Ammoniak vollständig befreit und auf 30 ccm eingedampft, sodann neutralisiert, mit 5 ccm  $\frac{1}{10}$ -n. Natronlauge und einer ätherischen Lösung von  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid versetzt und 5 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die abgelassene alkalische Lösung wurde filtriert, mit Salzsäure, die eine Trübung hervorrief, versetzt und abermals ausgeäthert. Die filtrierte ätherische Schicht hinterließ beim Abdunsten etwas am Gefäßboden sitzende sirupöse Substanz, die in 1—2 ccm Wasser unter Zusatz von 1 Tropfen Ammoniak gelöst und filtriert wurde. Nun erzeugte Salzsäure eine zuerst milchige Fällung, die beim Stehen, am besten in Eis, nach einiger Zeit in ein Aggregat von teils sternförmig gruppierten Nadeln überging. Durch mehrere Versuche wurde so viel erhalten, daß der Schmelzpunkt bestimmt und die Gegenwart von Stickstoff festgestellt werden konnte. Der Sinterungspunkt lag nach zweimaligem Umkrystallisieren aus ganz verdünntem Alkohol bei 148—149°. Vollständiges Schmelzen war bei 153° eingetreten. Naphthalinsulfo-glycin sintert bei 151°. Eine Mischung des Reaktionsproduktes mit letzterem ergab keine Änderung des Sinterungs- und Schmelzpunktes. Der in gleicher Weise mit 30 ccm Glykokoll-Lösung, die 0.01 g Glykokoll enthielt, durchgeführte Versuch gab genau die gleichen Resultate bezüglich Aussehen und Schmelzpunkt der Krystalle. Die Ausbeute des Naphthalinsulfochloridverfahrens ist bei den geringen Mengen Aminosäure so schlecht, daß eine Analyse erst nach Durchführung einer größeren Zahl weiterer Versuche möglich ist.

Es besteht aber bereits nach den bisher erhaltenen Ergebnissen kein Zweifel, daß die entstandene Aminosäure das Glykokoll ist.

Es ist hierdurch zum ersten Mal gelungen, aus den Ausgangsprodukten der natürlichen Synthese, der Kohlensäure, dem Ammoniak und dem Wasser ohne Verwendung anderer Stoffe lediglich durch Zuführung einer geeigneten Energieform, die mit der strahlenden in engem Zusammenhang steht, eine Aminosäure künstlich herzustellen, welche jedenfalls als eine der einfachsten Phasen im natürlichen Eiweißaufbau eine Rolle spielt.