

Ueber einen neuen stickstoffhaltigen Pflanzenbestandtheil.

Von

E. Schulze und E. Bosshard.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 23. September 1885).

In einer vor Kurzem zur Publikation gelangten Abhandlung ¹⁾ haben wir gezeigt, dass bei der Prüfung von Pflanzensäften und Pflanzenextracten auf stickstoffhaltige Stoffwechsel-Produkte die Untersuchung der Niederschläge, welche durch salpetersaures Quecksilberoxyd in jenen Flüssigkeiten hervorgerufen werden, gute Dienste leisten kann, da in diese Niederschläge Asparagin, Glutamin, Allantoin und Xanthinkörper eingehen; wir haben ferner dort schon erwähnt, dass wir mit Hülfe des genannten Fällungsmittels aus jungen Pflanzen von *Vicia sativa* (Futterwicke) und *Trifolium pratense* (Rothklee) einen neuen stickstoffreichen Körper zu gewinnen vermochten. Ueber diesen Körper, welchem wir den Namen Vernin beilegen wollen, können wir jetzt ausführlichere Mittheilungen machen.

Die Darstellung des Vernins geschah in folgender Weise: Die getrockneten und zerriebenen jungen Pflanzen wurden mit heissem Wasser extrahirt, die Extracte mit Bleiessig in schwachem Ueberschuss, sodann (nach Entfernung des Bleiniederschlags) mit salpetersaurem Quecksilberoxyd ²⁾ versetzt. Der durch dieses Reagens hervorgebrachte Niederschlag wurde

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 443.

²⁾ Wie die für diesen Zweck verwendete Lösung von salpetersaurem Quecksilberoxyd bereitet wurde, ist in einer früheren Abhandlung in dieser Zeitschrift (Bd. 9, S. 422) angegeben worden.

abfiltrirt, mit kaltem Wasser ausgewaschen, dann in Wasser aufgerührt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrirte Flüssigkeit neutralisirten wir mit Ammoniak und dunsteten sie im Wasserbade auf ein geringes Volumen ein.¹⁾ Einige Zeit nach dem Erkalten schied sich aus derselben eine amorphe Substanz von fast gallertartiger Beschaffenheit ab, gemengt mit kleinen Asparaginkrystallen, deren Anzahl sich bei längerem Stehen noch vermehrte. Die amorphe Substanz zertheilte sich beim Durchrühren in Flocken; sie liess sich ohne Schwierigkeit durch Filtration²⁾ von der Mutterlauge trennen und mit kaltem Wasser oder verdünntem Weingeist auswaschen.

Mach dem Abpressen zwischen Filtrirpapier bildete der Filterinhalt eine grauweisse leicht zu trocknende Masse. Durch Aufrühren derselben in verdünntem Weingeist und darauf folgendes Schlemmen liess sich der amorphe Theil des Filterinhalts ziemlich leicht von den beigemengten Asparaginkrystallen trennen. Als diese amorphe Substanz sodann in heissem Wasser gelöst³⁾, die filtrirte Lösung der Ruhe überlassen wurde, schieden sich aus derselben schon während des Erkaltes feine Krystalle in Menge ab. Nochmals aus Wasser umkrystallisirt, dann abfiltrirt und getrocknet, bildeten sie eine weisse glänzende Masse. Dieselbe bestand aus dem Vernin, noch verunreinigt durch eine geringe Menge eines Xanthinkörpers,⁴⁾ welcher aber durch Wiederholung des Umkrystallisirens entfernt werden konnte.

Die Trennung des Vernins vom Asparagin lässt sich, wie spätere Versuche zeigten, ausser auf dem beschriebenen Wege auch ohne Schwierigkeit durch fraktionirte Krystalli-

1) Da die neutralisirte Flüssigkeit während des Eindampfens wieder saure Reaction annimmt, so wurden während desselben noch einige Tropfen Ammoniakflüssigkeit oder Ammonium-Carbonat zugesetzt.

2) Wir verwendeten dazu ein Filter aus ziemlich grobmaschigem Filtrirzeug.

3) Beim Auflösen in Wasser blieb etwas Guanin zurück.

4) Dass ein solcher noch vorhanden war, ging daraus hervor, dass die mit überschüssiger Ammoniakflüssigkeit versetzte Lösung mit Silbernitrat noch eine geringe Fällung gab.

sation aus Wasser erreichen, da das Vernin schwerer löslich ist als Asparagin und sich weit rascher aus den Lösungen ausscheidet; ferner aber kann man eine Trennung der beiden Körper auch durch Silbernitrat erreichen, durch welches Vernin gefällt wird, Asparagin dagegen nicht. Ein Verfahren zur Trennung des Vernins von Xanthinkörpern würde sich, falls man durch Umkrystallisiren nicht schon zum Ziel kommt, auf den Umstand gründen lassen, dass die Silberverbindung des Vernins in Ammoniakflüssigkeit löslich ist, während von letzterer bekanntlich die Silberverbindungen der Xanthinkörper nicht aufgenommen werden.

Das durch mehrmaliges Umkrystallisiren gereinigte Vernin zeigte folgende Eigenschaften: Es ist schwer löslich in kaltem, leicht löslich in kochendem Wasser, nicht löslich in Alkohol. Aus der wässrigen Lösung scheidet es sich in feinen glänzenden Krystallen ab, welche unter dem Mikroskop als lange, schmale, äusserst dünne Prismen erscheinen (so dass sie dem unbewaffneten Auge meist den Anblick von Nadeln darbieten): in der Flüssigkeit umherschwimmend, zeigen sie lebhaften Seidenglanz. Die Abscheidung dieser Krystalle erfolgt so schnell, dass eine heiss gesättigte Lösung beim Erkalten binnen wenigen Minuten zu einem Krystallbrei wird. Wenn man sie auf's Filter bringt, zwischen Fliesspapier abpresst und dann trocknet, so lassen sie sich nachher sehr leicht als eine atlasglänzende Masse vom Filter ablösen.

In der wässrigen Lösung des Vernins erzeugt Silbernitrat eine gallertartige, durchsichtige Fällung, welche in Ammoniakflüssigkeit löslich ist (doch muss man ziemlich viel von letzterem Reagens anwenden). Mit salpetersaurem Quecksilberoxyd gibt die wässrige Lösung des Vernins einen weissen flockigen, mit Phosphorwolframsäure unter Salzsäurezusatz einen gelblichen Niederschlag; durch Bleiessig wird sie nicht gefällt, ebensowenig durch Kupferacetat (auch nicht beim Kochen). Aus der mit Pikrinsäure versetzten Lösung scheiden sich nach mehrstündigem Stehen feine gelbe Krystalle aus, welche unter dem Mikroskop ein moosähnliches Aussehen zeigen. Trägt man in die heisse wässrige Lösung Kupferoxyd-

hydrat ein, so geht kein Kupfer in Lösung; in geringer Menge scheint sich eine unlösliche Kupferverbindung zu bilden. In verdünnter Ammoniakflüssigkeit sowie in verdünnter Salzsäure und verdünnter Salpetersäure ist das Vernin leicht löslich. Löst man eine geringe Menge in verdünnter Salpetersäure und verdunstet die Lösung im Wasserbade zur Trockne, so bleibt ein hellgelber Fleck, welcher beim Befeuchten mit Ammoniakflüssigkeit intensiv rothgelb wird.

Wir haben das Vernin zuerst, wie oben erwähnt wurde, in jungen Wicken- und Kleepflanzen gefunden; sein Vorkommen beschränkt sich aber durchaus nicht auf diese Pflanzen. So fanden wir den genannten Stoff z. B. in den Cotyledonen der Kürbiskeimlinge. Die Darstellung aus denselben geschah in der gleichen Weise wie aus den zuvor genannten Pflanzen. Die getrockneten Cotyledonen wurden zerrieben und mit Wasser extrahirt, die wässrigen Extrakte zuerst mit Bleiessig, dann mit salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt; die durch letzteres Reagens hervorgebrachten Niederschläge in Wasser aufgerührt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus den so erhaltenen Flüssigkeiten schied sich das Vernin in amorphem Zustand aus, gemengt mit einer geringen Menge von Asparagin; von letzterem liess es sich leicht durch Umkrystallisiren befreien. Es zeigte nun alle Eigenschaften des aus den Wicken- und Kleepflanzen gewonnenen Vernins und stimmte mit letzterem auch in dem Aussehen unterm Mikroskop vollständig überein; einen weitem Beweis für die Identität beider Substanzen lieferten noch eine weiter unten zu erwähnende analytische Bestimmung sowie die Beobachtung, dass beide Körper bei der Zersetzung durch Salzsäure das gleiche Produkt gaben (man vergl. die weiter unten gemachten Angaben).

Einige unter Mitwirkung von Herrn J. Hungerbühler ausgeführte Versuche zeigten ferner, dass auch im Mutterkorn (*Secale cornutum*) Vernin sich findet; aus dem Quecksilberniederschlag, welcher in den aus Mutterkorn dargestellten wässrigen Extrakten (nach vorheriger Behandlung der letztern mit Bleiessig) durch salpetersaures Quecksilberoxyd hervor-

gebracht wurde, liess sich dasselbe leicht gewinnen. Es schied sich anfangs in grau-weissen Flocken aus, welche in heissem Wasser sich leicht lösten; aus der Lösung schieden sich Krystalle aus, welche im Aussehen mit den aus den andern Materialien gewonnenen Verninpräparaten vollständig übereinstimmten und alle oben angegebenen Reaktionen gaben. Eine Bestätigung der Identität lieferte eine weiter unten mitgetheilte analytische Bestimmung.

Aus einer Mutterkornsorte erhielten wir das Vernin in nicht ganz unbeträchtlicher Menge (aus 1 kg. lufttrockener Substanz ungefähr 1 gr. Vernin); eine andere Sorte, von welcher wir einige kg. verarbeiteten, lieferte aber leider eine viel geringere Ausbeute. Aehnlich war es mit den Kürbiskeimlingen; aus den Cotyledonen einiger Vegetationen solcher Keimlinge liess sich Vernin ziemlich leicht gewinnen; andere Cotyledonen (von etwas älteren Keimlingen) lieferten nur äusserst wenig Vernin. Die letzteren enthielten ziemlich viel Tyrosin, dessen Vorhandensein die Isolirung des Vernins erschwerte.

Für die Elementar-Analyse des Vernins benutzten wir hauptsächlich ein aus Wickenpflanzen gewonnenes, wiederholt aus Wasser umkrystallisirtes Präparat. Wir erhielten für die bei 100° getrocknete Substanz folgende Zahlen:

1. 0,2008 gr. Substanz gaben 0,3084 gr. CO² und 0,0872 gr. H²O.
2. 0,2016 gr. Substanz gaben 0,3144 gr. CO² und 0,0910 gr. H²O.
3. 0,1836 gr. Substanz gaben nach der Methode von Kjeldahl 0,0448245 gr. N in Ammoniakform (= 11,5 cbcm. Barytwasser)¹).
4. 0,2052 gr. Substanz gaben, nach derselben Methode 0,049892 gr. N in Ammoniakform (= 12,8 cbcm. Barytwasser).
5. 0,2795 gr. Substanz (von dem aus Mutterkorn dargestellten Präparat) gaben bei der volumetrischen Stickstoff-Bestimmung 63,9 cbcm. N bei 724 mm. Bar. und 21° = 0,069218 gr. N.²)

Ein Gehalt an Schwefel konnte im Vernin nicht nachgewiesen werden. Zu bemerken ist noch, dass die für die Analyse benutzten Präparate nicht absolut aschenfrei waren.

¹) Titre des Barytwassers: 1 cbcm. = 0,0038978 gr. N.

²) Herr E. Steiger hatte die Gefälligkeit, diese Stickstoffbestimmung auszuführen.

Gefunden:

	1.	2.	3.	4.	5.
C	41,89 ⁰ / ₀	42,53 ⁰ / ₀	—	—	—
H	4,82 »	5,01 »	—	—	—
N	—	—	24,41 ⁰ / ₀	24,37 ⁰ / ₀	24,77 ⁰ / ₀
O	—	—	—	—	—

Die Mittel aus diesen Zahlen entsprechen recht gut den von der Formel $C^{16}H^{20}N^8O^8$ geforderten Werthen¹⁾, wie die folgende Zusammenstellung zeigt:

	Berechnet für $C^{16}H^{20}N^8O^8$:	Gefunden im Mittel:
C	42,47 ⁰ / ₀	42,21 ⁰ / ₀
H	4,42 »	4,92 »
N	24,78 »	24,52 »
O	28,33 »	—

Den oben aufgeführten Ergebnissen der Analyse würde auch die Formel $C^{10}H^{13}N^5O^5$ (welche 42,40% C, 4,59% H, 24,73% N und 28,28% O verlangt) entsprechen; doch lässt sich der Silbergehalt, welcher in der Silberverbindung des Vernins gefunden wurde, mit dieser Formel nicht in Einklang bringen.

Das lufttrockene Vernin verlor, bei 100° im Luftbade getrocknet, 10,80% an Gewicht (0,2963 gr. lufttrockene Substanz erlitten eine Gewichtsabnahme von 0,0320 gr.). Diese Gewichtsabnahme entspricht der Annahme, dass im lufttrockenen Vernin 3 Mol. Krystallwasser enthalten sind (die Formel $C^{16}H^{20}N^8O^8 + 3 H^2O$ verlangt 10,67% Wasser).

Das bei 100° getrocknete Vernin erwies sich als äusserst hygroskopisch — ein Umstand, durch welchen vermuthlich die Analysen-Fehler, insbesondere bei der Wasserstoffbestimmung, vergrössert worden sind.

Es wurden ferner noch Silberbestimmungen in der Silberverbindung des Vernins ausgeführt. Diese Verbindung schied sich beim Vermischen einer noch etwas warmen gesättigten

¹⁾ Diese Formel darf nicht halbirt werden, weil bei der Zersetzung des Vernins eine ihrem Verhalten nach für Guanin = $C^5H^5N^5O$ zu erklärende Substanz entsteht — wie weiter unten nachgewiesen werden wird.

Verninlösung mit Silbernitratlösung als eine durchsichtige Gallerte aus. Dieselbe wurde auf ein Filter gebracht, mit kaltem Wasser anhaltend ausgewaschen, auf Filtrirpapier gelegt, bis die Flüssigkeit möglichst abgesogen war, dann über Schwefelsäure langsam ausgetrocknet. Sie bildete nur eine durchscheinende, etwas bräunlich gefärbte Masse, welche beim Trocknen im Luftbade nicht mehr an Gewicht abnahm. Die Silberbestimmung lieferte folgende Resultate:

1. 0,1435 gr. Substanz (dargestellt aus dem aus Wickenpflanzen gewonnenen Vernin-Präparat) gaben beim Glühen 0,0460 gr. metallisches Silber.
2. 0,290 gr. Substanz (dargestellt aus dem aus Kürbiskeimlingen gewonnenen Vernin-Präparat) gaben beim Glühen 0,0930 gr. metallisches Silber.

Diese Ergebnisse entsprechen der Formel $C^{16}H^{18}Ag^2N^8O^8$, wie folgende Zusammenstellung zeigt:

	Berechnet:	Gefunden:	
		1.	2.
Ag	32,43 ⁰ ₀	32,06 ⁰ ₀	32,07 ⁰ ₀

Die Vernin-Quantität, welche wir zur Zeit zur Verfügung hatten, war nicht gross genug, um die Zersetzungen dieses Körpers bei Einwirkung verschiedener Reagentien eingehend studiren zu können; wir haben aber doch wenigstens die Thatsache zu constatiren vermocht, dass beim Erhitzen des Vernins mit Salzsäure ein Spaltungsprodukt entsteht, welches nach seinen Reaktionen für Guanin erklärt werden muss.

Die Versuche, welche zu diesem Ergebniss führten, wurden in folgender Weise ausgeführt: Das Vernin wurde mit verdünnter Salzsäure einige Stunden lang am Rückflusskühler gekocht, die Flüssigkeit durch Eindampfen im Wasserbade concentrirt und sodann mit Ammoniak übersättigt. Es schied sich eine gelbliche, dem unbewaffneten Auge amorph erscheinende Substanz aus, welche sich nicht in Wasser und in Ammoniakflüssigkeit, dagegen leicht in warmer verdünnter Salzsäure löste. Beim Verdampfen derselben mit concentrirter Salpetersäure im Wasserbade blieb ein gelber Rückstand,

welcher durch Natronlauge roth gefärbt wurde. Aus der Auflösung der Substanz in Salzsäure krystallisirte das salzsäure Salz in feinen Nadeln. Als der Lösung dieses Salzes (hergestellt unter Zusatz einiger Tropfen verdünnter Salzsäure) Pikrinsäure-Solution zugefügt wurde, schied sich nach kurzer Zeit das pikrinsaure Salz in gelben, zu Kugeln vereinigten Krystallflittern aus, im Aussehen vollständig mit dem pikrinsauren Guanin übereinstimmend und den von Capranica¹⁾ gemachten Angaben entsprechend. Mit ammoniakalischer Silbersolution gab die Lösung des salzsauren Salzes eine in Ammoniak unlösliche Fällung, welche sich in heisser verdünnter Salpetersäure (vom specifischen Gewicht 1,1) auflöste; aus der Lösung schieden sich während des Erkaltens feine nadelförmige Krystalle aus.

Das aus dem Vernin erhaltene Spaltungsprodukt stimmte also in seinem Verhalten vollkommen mit Guanin überein; und da bis jetzt ausser letzterem keine Substanz bekannt ist, welche alle oben aufgeführten Reaktionen giebt, so muss jenes Spaltungsprodukt für Guanin erklärt werden. Eine Identificirung durch Elementaranalyse vermöchten wir bis jetzt nicht auszuführen, da wir nur wenig Vernin für die Zersetzung verwenden konnten und demnach das beschriebene Spaltungsprodukt nur in geringer Menge erhielten.

Sowohl das aus den Wicken, wie das aus den anderen Materialien (Kürbiskeime und Mutterkorn) dargestellte Vernin lieferte bei der Zersetzung die dem Guanin gleichende Substanz. Die Ausbeute daran betrug ungefähr $\frac{1}{3}$ vom Gewicht des angewendeten Vernins. Welche Produkte daneben bei der Zersetzung des Vernins noch entstanden, vermögen wir zur Zeit nicht anzugeben (auf Zucker wurde die Zersetzungsflüssigkeit mit negativem Resultat geprüft).

Dass in den Vernin-Präparaten das Guanin nicht als solches enthalten gewesen sein kann, sondern sich erst bei

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 4, S. 233.

der Zersetzung des Vernins gebildet haben muss, braucht kaum hervorgehoben zu werden. Der Beweis dafür liegt ja schon in dem Umstande, dass die in der Verninlösung durch Silbernitrat erzeugte Fällung in Ammoniakflüssigkeit löslich ist. Eine Beimengung von Guanin müsste sich durch Entstehung eines in Ammoniak unlöslichen Silberniederschlages zu erkennen geben.

Das Vernin, dessen Eigenschaften wir im Vorigen beschrieben haben, ist ohne Zweifel eine in den Pflanzen ziemlich verbreitete Substanz. Wir haben es, wie im Vorstehenden mitgetheilt wurde, in Wicken- und Rothkleepflanzen, in Kürbiskeimlingen und im Mutterkorn mit Sicherheit nachweisen können. Aber auch aus junger Luzerne (*Medicago sativa*) erhielten wir (in geringer Menge) eine dem Vernin gleichende Substanz. Ferner scheint Vernin auch in dem von Herrn Dr. A. von Planta im hiesigen Laboratorium untersuchten Blütenstaube von *Pinus silvestris* enthalten zu sein. Weitere Mittheilungen darüber behalten wir uns vor.

Die Quantität, in welcher das Vernin in den bis jetzt untersuchten Objekten sich findet, ist nicht bedeutend und allem Anschein nach sehr schwankend. Schon oben wurde erwähnt, dass wir aus einer Mutterkorn-Sorte pro Kilogramm lufttrockener Substanz ungefähr 1 gr. Vernin, aus einer zweiten viel weniger erhielten, dass auch der Vernin-Gehalt der Kürbiskeimlinge grossen Schwankungen unterworfen war. Aehnlich war es mit den Wickenpflanzen. Aus einer Sorte derselben erhielten wir pro Kilo der lufttrockenen Substanz ca. $\frac{1}{2}$ gr. Vernin, aus einer zweiten viel weniger. Das sind Schwankungen, welche begreiflicher Weise die Aufgabe, eine grössere Vernin-Quantität darzustellen, sehr erschweren.

Man kann fragen, ob nicht vielleicht die Schwankungen in der Ausbeute darauf zurückzuführen sind, dass während der Darstellung ein mehr oder weniger grosser Theil des Vernins sich zersetzt. Wenn dies auch nicht für unmöglich erklärt werden kann, so liegen doch bestimmte Anhaltspunkte

für eine solche Annahme bis jetzt nicht vor¹⁾). Auch haben wir bislang keine Modifikation des oben beschriebenen Abscheidungsverfahrens auffinden können, welche eine bessere Ausbeute geliefert hätte.

1) In den wässerigen Extrakten aus Wickenpflanzen und Kürbiskeimlingen findet sich neben Vernin auch Guanin vor. Man könnte sich denken, dass dasselbe während der Darstellung und der Verarbeitung der Extrakte durch Zersetzung von Vernin entstanden sei. Wir wissen aber andererseits, dass Guanin und andere Xanthinkörper in den Pflanzenextrakten verbreitet sind und dass sie nach den Untersuchungen von A. Kossel aus den Nucleinen entstehen können. Wenn es demnach auch nicht als unwahrscheinlich bezeichnet werden kann, dass ein Theil jenes Guanins sich durch Zersetzung von Vernin gebildet hat, so kann man dies doch nicht als sicher hinstellen.