

Über die aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* und *Lupinus albus* darstellbaren Monoaminosäuren.

Von

E. Schulze und E. Winterstein.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.
(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

Zur Trennung der von E. Schulze und seinen Mitarbeitern aus Keimpflanzen dargestellten vier Monoaminosäuren, nämlich der Aminovaleriansäure, des Leucins, des Phenylalanins und des Tyrosins, haben unvollkommene Methoden gedient. Das bei Verarbeitung der Pflänzchen erhaltene rohe Aminosäurengemenge wurde zunächst aus einem heißen Gemisch von Alkohol und konzentrierter Ammoniakflüssigkeit umkristallisiert, wobei das etwa vorhandene Tyrosin wegen seiner Schwerlöslichkeit in jenem Gemisch größtenteils zurückblieb. Das umkristallisierte Produkt wurde in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Kupferhydroxyd versetzt: bestand nun jenes Produkt im wesentlichen aus Phenylalanin und Aminovaleriansäure, wie dies in mehreren Fällen zutraf, so schied sich nahezu reines Phenylalaninkupfer aus, während Aminovaleriansäure mit einem Teil des Phenylalanins als Kupferverbindung in der tiefblauen Mutterlauge gelöst blieb. Die erstere Aminosäure ließ sich rein erhalten, indem man die vom Kupfer befreite Mutterlauge eindunstete und das dabei erhaltene Produkt wiederholt umkristallisierte. Schwieriger war die Trennung, wenn neben Phenylalanin und Aminovaleriansäure Leucin in größerer Menge sich vorfand, da letzteres teils mit dem Phenylalanin sich als Kupferverbindung ausschied, teils mit der Aminovaleriansäure in Lösung blieb. Wie wir in solchem Falle verfahren, um die genannten Aminosäuren neben einander nachzuweisen, ist in den früher publizierten Abhandlungen beschrieben worden:

hier sei nur noch erwähnt, daß wir zur Isolierung des Phenylalanins auch die Fällbarkeit dieser Aminosäure durch Phosphorwolframsäure benutzt haben.

Nachdem Emil Fischer¹⁾ sein Verfahren zur Trennung der Aminosäuren beschrieben hatte, war es geboten, dasselbe auch auf die aus den Keimpflanzen darstellbaren Stoffe solcher Art anzuwenden: man durfte hoffen, auf diesem Wege neben den bisher aus Pflanzen isolierten Aminosäuren noch einige andere Glieder dieser Stoffgruppe nachweisen zu können. Wir haben jenes Verfahren auf die Aminosäuren angewendet, die sich aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* und *Lupinus albus* gewinnen lassen.

Bei Untersuchung dieser Keimpflanzen stellten wir uns noch zwei andere Aufgaben. Erstens prüften wir, ob in den Pflänzchen auch das von F. Ehrlich²⁾ entdeckte Isoleucin, dessen Trennung vom Leucin auf der Löslichkeit seiner Kupferverbindung in Methylalkohol beruht, sich vorfindet; zweitens untersuchten wir die Pflänzchen auf das Vorhandensein von Tryptophan. Bekanntlich ist der Nachweis und die Isolierung dieses Körpers durch die von Hopkins und Cole³⁾ angegebenen Verfahren ermöglicht worden.

Ehe wir zur Trennung des Isoleucinkupfers vom Leucinkupfer den Methylalkohol verwendeten, prüften wir noch das Verhalten des letzteren gegen die Kupferverbindungen einiger anderen Aminosäuren. Es zeigte sich, daß die Kupfersalze des Glykokolls, des Alanins,⁴⁾ des Leucins, des Phenylalanins und des Tyrosins sich in kaltem Methylalkohol entweder gar nicht, oder doch nur in äußerst geringer Menge lösten. Anders verhielt sich das aminovaleriansaure Kupfer, dargestellt aus einem aus Keimpflanzen gewonnenen Aminovaleriansäurepräparat. Beim Übergießen dieses Salzes mit Methylalkohol entstand rasch eine blaugefärbte Lösung. Um den Löslichkeitsgrad des Salzes

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 150 u. 412; Bd. XXXV, S. 70.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1809.

³⁾ Journal of Physiol. (1902), Bd. XXVII, S. 418.

⁴⁾ Zur Verwendung kam ein aus racemischem Alanin dargestelltes Kupfersalz.

zu bestimmen, ließen wir ca. 1 g desselben mit einer zur völligen Auflösung nicht hinreichenden Quantität von entwässertem Methylalkohol unter wiederholtem Umschütteln längere Zeit in Berührung: von der vom Ungelösten abfiltrierten Flüssigkeit wurde sodann ein abgewogenes Quantum eingedunstet, das dabei zurückbleibende Salz getrocknet und gewogen. Wir erhielten so folgende Zahlen:

1. 11,1236 g Lösung gaben beim Eindunsten 0,2116 g Rückstand: 0,2116 g des Kupfersalzes hatten sich also in 10,9120 g Methylalkohol gelöst. Daraus ergibt sich eine Löslichkeit von 1 : 52,0 bei 18° C.

2. 19,6716 g Lösung gaben beim Eindunsten 0,3726 g Rückstand: 0,3726 g des Kupfersalzes hatten sich also in 19,2990 g Methylalkohol gelöst. Daraus ergibt sich eine Löslichkeit von 1 : 51,8 bei 18° C.

Für eine dritte Bestimmung verwendeten wir nicht wasserfreien Methylalkohol, sondern ein direkt dem Handel entnommenes Produkt. Die Bestimmung gab folgendes Resultat:

20,0804 g Lösung gaben 0,3750 g Rückstand: 0,3750 g des Kupfersalzes hatten sich also in 19,7054 g Methylalkohol gelöst. Daraus ergibt sich eine Löslichkeit von 1 : 52,6 bei 18° C.

Nach den Versuchen von F. Ehrlich löst sich ein Teil Isoleucinkupfer in 55 Teilen Methylalkohol bei 17° C.: das aminovaleriansaure Kupfer zeigt also ungefähr die gleiche Löslichkeit in diesem Alkohol, wie das Isoleucinkupfer. Eine Trennung dieser beiden Kupfersalze mit Hilfe von Methylalkohol läßt sich also nicht ausführen: dagegen kann man dieses Lösungsmittel zur Trennung der Aminovaleriansäure vom Leucin und von anderen Aminosäuren, deren Kupfersalze darin unlöslich sind, benutzen. Festzustellen wird noch sein, ob etwa unter den Eiweißzersetzungsprodukten auch eine Aminovaleriansäure sich findet, deren Kupfersalz in Methylalkohol unlöslich ist: einige in unserem Laboratorium gemachte Beobachtungen scheinen dies anzudeuten.

Da nach den von verschiedener Seite gemachten Angaben der Löslichkeitsgrad des Leucinkupfers, sowie anderer schwerlöslicher Kupferverbindungen von Aminosäuren in Wasser durch das gleichzeitige Vorhandensein anderer leicht löslicher Kupfer-

verbindungen solcher Art stark beeinflusst wird, so kann man fragen, ob etwas Ähnliches für die Löslichkeit der Kupferverbindungen in Methylalkohol gilt. Es wäre ja z. B. denkbar, daß in einer Lösung von aminovaleriansaurem Kupfer in Methylalkohol Leucinkupfer sich in gewissem Grade auflöst, während es in reinem Methylalkohol unlöslich ist. Doch liegt kein Grund für eine solche Annahme vor. Wie aus den weiter unten gemachten Mitteilungen sich ersehen läßt, haben wir reine Aminovaleriansäure aus einem Kupfersalz erhalten, das wir durch Auflösung in Methylalkohol vom Leucinkupfer trennten. Zu diesem Resultat hätten wir aber nicht gelangen können, wenn das Leucinkupfer sich in einer methylalkoholischen Lösung von aminovaleriansaurem Kupfer partiell gelöst hätte. Auch die von F. Ehrlich in bezug auf das Isoleucin erhaltenen Ergebnisse stehen jener Annahme entgegen.

Die von uns untersuchten Keimpflanzen waren teils bei Lichtabschluß, teils bei schwachem Lichtzutritt¹⁾ in Sand gezogen worden: sie kamen teils nach 8—9tägiger, teils nach 18—20tägiger Vegetationsdauer zur Verwendung. Warum wir Pflänzchen von ungleichem Alter für die Untersuchung verwendeten, ist noch mit einigen Worten zu erklären. Aus den in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchungen ist zu schließen, daß die primären Eiweißzersetzungsprodukte im Stoffwechsel der Keimpflanzen teils schneller, teils weniger schnell eine Umwandlung erfahren. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, bei Untersuchung der Pflänzchen alle beim Eiweißzerfall entstandenen Produkte neben einander vorzufinden, dann am größten, wenn die Pflänzchen in einem Vegetationsstadium untersucht werden, in welchem in ihnen noch starker Eiweißzerfall stattfindet. In einem späteren Vegetationsstadium können dagegen manche der primären Eiweißzersetzungsprodukte infolge der inzwischen erfolgten Umwandlung fehlen oder doch nur in sehr kleiner Menge sich vorfinden. Andererseits können

1) Wenn die Keimpflanzen schon nach kurzer Dauer ihrer Vegetation, z. B. nach 8—9 Tagen, geerntet werden, so kommt nichts darauf an, ob während ihrer Entwicklung das Licht vollständig oder weniger vollständig abgehalten wird.

Keimpflanzen von höherem Alter sehr geeignete Objekte zur Darstellung derjenigen Eiweißzersetzungsprodukte sein, welche der schnellen Umwandlung im Stoffwechsel entgangen sind und sich demnach in den Pflänzchen angehäuft haben. Es war für uns also das richtigste, Keimpflanzen von ungleichem Alter für unsere Versuche zu verwenden.

a) 8–9tägige Keimpflanzen von *Vicia sativa*.

Die Keimpflanzen von *Vicia sativa* sind in unserem Laboratorium schon mehrmals untersucht worden.¹⁾ In 6–7tägigen Pflänzchen solcher Art fand man neben einer geringen Tyrosinmenge Leucin, ferner auch Arginin, Lysin und Histidin. In mehrwöchentlichen etiolierten Pflänzchen wurden Leucin, Aminovaleriansäure und Phenylalanin, ferner auch Cholin, Betain und Guanidin nachgewiesen. Es war nun zu prüfen, ob neben den früher schon isolierten Monoaminosäuren mit Hilfe der in der Einleitung genannten Methoden noch andere aus solchen Keimpflanzen sich darstellen ließen.

Die getrockneten und zerriebenen Pflänzchen²⁾ wurden zuerst mit 92%igem, dann mit 90%igem Weingeist ausgekocht, die vereinigten Extrakte der Destillation unterworfen. Den Destillationsrückstand nahmen wir in Wasser auf, versetzten die trübe Flüssigkeit mit Tannin, beseitigten den dadurch erzeugten Niederschlag durch Filtration, fügten dem Filtrate Bleiessig in schwachem Überschuß zu, filtrierten wieder, befreiten das Filtrat mittels Schwefelwasserstoff vom Blei und engten es hierauf in flachen Porzellanschalen im Wasserbade ein, bis auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein Häutchen sich bildete; dann ließ man erkalten. Es bildete sich nun eine größtenteils aus Aminosäuren bestehende Ausscheidung. Sie wurde nach Verlauf von einigen Tagen mit Hilfe einer Nutsche von der sirupösen Mutterlauge getrennt, nachdem letztere mit etwas Alkohol vermischt worden war. Die auf der Nutsche ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 193, und Bd. XXX, S. 341.

²⁾ Die von uns in der oben beschriebenen Weise verarbeiteten Keimpflanzen waren unter Aufwendung von ca. 20 kg Wickensamen dargestellt worden.

bliebene Masse wurde mit etwas Weingeist gewaschen, dann zur Entfernung des Restes der Mutterlauge auf Tonplatten gestrichen. Sie bildete nun eine nicht stark gefärbte, zerreibliche Masse, die das Aussehen des unreinen Leucins besaß. Diese Masse wurde zerrieben und sodann mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die dabei entstandene Lösung fügten wir der sirupösen Mutterlauge zu. Das Gewicht des beim Auskochen mit Alkohol verbliebenen Rückstandes betrug nach dem Trocknen etwas mehr als 50 g. Da aus den bei Untersuchung der Wickenkeimpflanzen früher gemachten Beobachtungen geschlossen werden durfte, daß dieser Rückstand in der Hauptsache aus Leucin bestand, so haben wir denselben nicht für die Veresterung verwendet (wir benutzten dazu, wie aus dem weiter unten Mitgeteilten zu ersehen ist, nur die von diesem Produkt abgeflossene Mutterlauge); dagegen untersuchten wir diesen Rückstand auf Isoleucin. Zu diesem Zweck wurde derselbe zunächst zweimal aus einem heißen Gemisch von Alkohol und konzentrierter Ammoniakflüssigkeit umkristallisiert. Das so erhaltene, fast farblose Produkt lösten wir in heißem Wasser und fügten der Lösung Kupferhydroxyd in schwachem Überschuß zu. Schon in der Wärme schied sich eine Kupferverbindung aus; sie wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Die davon abfiltrierte tiefblaue Flüssigkeit wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand getrocknet. Die so erhaltenen Kupfersalze behandelten wir nun bei Zimmertemperatur mit Methylalkohol. Es zeigte sich, daß von dem beim Eindunsten der Mutterlauge erhaltenen Kupfersalz sich ein ansehnlicher Teil, von dem anderen dagegen nur wenig in Methylalkohol löste. Die vereinigten methylalkoholischen Extrakte wurden der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand in Wasser aufgenommen und durch Schwefelwasserstoff zersetzt, die im Filtrat vom Schwefelkupfer erhaltene Aminosäure sodann zur Kristallisation gebracht und hierauf noch einmal aus Wasser, unter Zusatz von etwas Weingeist, umkristallisiert. Das in dieser Weise erhaltene Produkt glich im Aussehen dem Leucin; es verflüchtigte sich beim Erhitzen im Röhren unter Bildung eines weißen Sublimates, war

schwer löslich in kaltem Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol.
Die Analyse gab folgende Resultate:

1. 0,2145 g Substanz gaben 21,2 ccm Stickstoffgas bei 722 mm Druck und 14° C. = 0,023677 g N;
2. 0,1100 g Substanz gaben 11,1 ccm Gas bei 720 mm Druck und 15° C. = 0,0122448 g N.

Berechnet	Gefunden:	
für $C_6H_{13}NO_2$:	1.	2.
N = 10,70%	11,03%	11,13%

Der gefundene Stickstoffgehalt übersteigt, wie man sieht, ein wenig denjenigen des Leucins: in Anbetracht des Umstandes, daß die volumetrische Stickstoffbestimmung in der Regel ein wenig zu hohe Zahlen liefert, kann die Differenz wohl als unbedeutend bezeichnet werden. Wahrscheinlich ist, daß ein Isoleucinpräparat vorlag, welchem noch ein wenig Aminovaleriansäure beigemischt war.

Wir bestimmten nun das spezifische Drehungsvermögen der wässrigen Lösung dieses Präparates. Dabei ergab sich folgendes Resultat:

Eine wässrige Lösung, die in 20 ccm 0,50 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 16° C. 1,4° S. V. nach rechts: demnach ist $(\alpha) D^{16} = + 9,6^\circ$.

F. Ehrlich (loc. cit.) fand für Isoleucin in wässriger Lösung $(\alpha) D^{20} = + 9,74^\circ$. Da die von uns verwendete Lösung nur eine geringe Konzentration besaß, so muß es als möglich bezeichnet werden, daß der von uns ausgeführten Bestimmung kein hoher Grad von Genauigkeit zukommt. Wir bestimmten daher auch noch das spezifische Drehungsvermögen, welches die von uns dargestellte Aminosäure in salzsaurer Lösung besaß:

Eine Lösung in 20%iger Salzsäure, welche in 10 ccm 1 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 16° C. 20,5° S. V. nach rechts: demnach ist $(\alpha) D^{16} = + 35,2^\circ$.

F. Ehrlich fand für Isoleucin in 20%iger Salzsäure $(\alpha) D^{20} = + 36,8^\circ$. Daß wir für unser Präparat ein etwas schwächeres Drehungsvermögen fanden, wird wahrscheinlich seinen Grund darin haben, daß dieses Präparat noch eine kleine Quantität von Aminovaleriansäure einschloß.¹⁾

¹⁾ Für Aminovaleriansäure wurde $(\alpha) D^{16} = + 27,9^\circ$ gefunden.

Wenn man neben den im vorigen mitgeteilten Versuchsergebnissen auch noch den Umstand berücksichtigt, daß das Kupfersalz unserer Aminosäure in Methylalkohol löslich war, so kann man nicht daran zweifeln, daß Isoleucin vorlag, allerdings wohl noch verunreinigt durch ein wenig Aminovaleriansäure. Wir erinnern hier auch noch daran, daß wir früher schon aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* eine im Stickstoffgehalt mit Leucin übereinstimmende Substanz erhielten,¹⁾ deren spezifisches Drehungsvermögen zwischen demjenigen des Leucins und des Isoleucins lag: daß diese Substanz ein Gemenge dieser beiden Aminosäuren war, muß jetzt für sehr wahrscheinlich erklärt werden.

Wie aus den oben gemachten Angaben zu ersehen ist, erhielten wir das Isoleucin aus dem in Methylalkohol löslichen Anteil der Kupfersalze, über deren Darstellung oben berichtet wurde. Der in dem genannten Lösungsmittel unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff eine im Aussehen und im Verhalten dem Leucin gleichende Aminosäure. Für reines Leucin ist es charakteristisch, daß seine heiße wässrige Lösung auf Zusatz von Kupferacetat sofort oder nach kurzer Zeit eine aus feinen Kristallblättchen bestehende Kupferverbindung fallen läßt. Das von uns in der beschriebenen Weise erhaltene Leucin lieferte eine solche Kupferverbindung in reichlicher Menge. Die daraus wieder abgeschiedene Aminosäure wurde zur Kristallisation gebracht und sodann im Soleil-Ventzkeschen Polarisationsapparat untersucht. Dabei ergab sich folgendes Resultat:

Eine Lösung in 20% iger Salzsäure, die in 10 ccm 0,50 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 16° C. 5° nach rechts: demnach ist $(\alpha) D = + 17,2^\circ$.

Dieses Resultat stimmt mit der für ein Leucinpräparat aus Conglutin gefundenen Zahl $[(\alpha) D = + 17,3^\circ]$ sehr gut überein. Eine etwas höhere Zahl, nämlich $(\alpha) D = + 17,8^\circ$, haben wir früher unter gleichen Bedingungen für ein aus Wickenkeimpflanzen dargestelltes Leucinpräparat gefunden.²⁾ Möglich ist, daß das letztere noch ein wenig Isoleucin eingeschlossen hat.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 306.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 305.

Die aus unserem Leucinpräparat dargestellte Kupferverbindung gab bei der Analyse folgendes Resultat:¹⁾

0,2150 g Substanz gaben 0,0525 g $\text{CuO} = 19,50\%$ Cu.

Die Theorie verlangt für Leucinkupfer einen Gehalt von 19,55% Cu.

Ohne Zweifel war Leucin diejenige Aminosäure, die in dem früher beschriebenen Rohprodukt (Gewicht ca. 50 g) in größter Menge enthalten war. Das neben Leucin erhaltene Isoleucinpräparat wog nur ca. 2 g.

Die von jenem Rohprodukt abfiltrierte dickflüssige Mutterlauge lieferte bei weiterem Verdunsten noch eine Ausscheidung, die sich jedoch von dem Sirup nicht gut trennen ließ. Wir wendeten nun auf diese Mutterlauge das Esterverfahren E. Fischers an, in der Hoffnung, daß es möglich sein werde, die Aminosäurenester durch Extraktion mit Äther von den übrigen Bestandteilen der Mutterlauge (Kohlenhydrate, Basen etc.) zu trennen. Diese Hoffnung ging in der Tat in Erfüllung. Was die Ausführung der Operationen betrifft, so braucht nur gesagt zu werden, daß dreimal unter Zusatz von je 1 l Alkohol verestert wurde. Die Abscheidung der Ester mittels Äther, Lauge und Pottasche war wegen des gleichzeitigen Vorhandenseins von Kohlenhydraten und von den bei Einwirkung der Salzsäure auf letztere entstandenen humosen Produkten infolge Bildung einer Emulsion nicht ganz leicht; indessen gelang es doch, eine beträchtliche Quantität von Estern zu isolieren. Bei der fraktionierten Destillation der letzteren im Vacuum zeigte sich, daß bei einer unter 80° liegenden Temperatur noch keine Ester übergangen; über den Siedepunkt und über die Quantität der bei der Destillation erhaltenen Fraktionen gibt die nachfolgende Tabelle Aufschluß:

	Druck	Temperatur	Gewicht
I.	10	80°	4
II.	10	100°	18,2
III.	10	120°	4,5
IV.	10	120—140°	3,4

¹⁾ Bei Ausführung der Kupferbestimmungen wurden die zuvor bei 100—105° getrockneten Kupfersalze durch Erhitzen über einer kleinen Flamme langsam zersetzt. Den dabei im Tiegel verbliebenen Rückstand glühten wir dann stark bis zur völligen Konstanz des Gewichtes.

Die Fraktionen I bis III wurden durch Kochen mit Wasser verseift, die dabei entstandenen Aminosäuren zur Trockne gebracht und sodann mit Alkohol extrahiert. Das Extrakt untersuchten wir auf α -Pyrrolidinkarbonsäure. Letztere schien in sehr kleiner Menge vorhanden zu sein, konnte aber nicht sicher nachgewiesen werden.

Über die Art und Weise, in der wir die aus den Fraktionen I bis III erhaltenen Aminosäuren weiter behandelten, und über die dabei erhaltenen Resultate ist folgendes anzugeben: Die Aminosäuren der Fraktion I wurden in die Kupfersalze übergeführt, letztere sodann bei Zimmertemperatur mit Methylalkohol behandelt. Der größte Teil der Kupfersalze ging in Lösung, nur ein kleiner Teil blieb ungelöst zurück. Der letztere lieferte bei der Zerlegung eine Aminosäure, die im Aussehen dem Leucin glich und sowohl beim Erhitzen im Glasröhrchen als auch beim Versetzen ihrer heißen wässerigen Lösung mit Kupferacetat sich wie Leucin verhielt. Ihre Quantität war sehr gering: eine Analyse wurde nicht ausgeführt. Der in die methylalkoholische Lösung übergegangene Teil der Kupfersalze wurde nach dem Abdestillieren des Methylalkohols in Wasser gelöst, die Lösung zur Kristallisation eingedunstet. Das dabei erhaltene, aus blättrigen Kristallen bestehende Kupfersalz gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0.1970 g Substanz gaben 0,0516 g CuO = 20,86% Cu.

Diese Zahl liegt zwischen dem Kupfergehalt des aminovaleriansauren Kupfers (21,47% Cu) und demjenigen des Isoleucinkupfers (19,55% Cu). Es ist demnach das wahrscheinlichste, daß der in Methylalkohol lösliche Teil der Kupfersalze aus einem Gemenge von aminovaleriansaurem Kupfer und Isoleucinkupfer bestand; doch war wohl das erstere Salz in größerer Quantität vorhanden, als das letztere.

Die Aminosäuren der Fraktion II wurden gleichfalls in die Kupfersalze übergeführt. Der größte Teil dieser Kupfersalze war löslich in Methylalkohol. Die methylalkoholische Lösung wurde der Destillation unterworfen. Nachdem etwa die Hälfte des Lösungsmittels abdestilliert worden war, ließ man die rückständige Flüssigkeit erkalten. Sie lieferte eine starke Aus-

scheidung von dunkelblauen Kristallen. Nachdem die Mutterlauge abgossen worden war, wurden diese Kristalle mehrmals mit kaltem Methylalkohol gewaschen, dann in kaltem Wasser gelöst. Die von einem kleinen Rückstand abfiltrierte Lösung lieferte beim Verdunsten blättrige Kristalle, bei deren Analyse folgendes Resultat erhalten wurde:

0,2555 g Substanz gaben 0,0678 g CuO = 21,04% Cu.

Diese Zahl liegt nicht viel unter dem von der Formel des aminovaleriansauren Kupfers geforderten Werte.

Die bei der Zerlegung dieser Kupferverbindung erhaltene Aminosäure wurde aus Wasser umkristallisiert und sodann analysiert:

0,2246 g Substanz gaben 24,0 ccm Stickstoffgas
bei 16° C. und 716 mm Druck = 0,02628 g oder 11,70% N.

Der Stickstoffgehalt dieses Präparates lag also nicht viel unter demjenigen der Aminovaleriansäure. Unter gleichzeitiger Berücksichtigung des bei Analyse des Kupfersalzes erhaltenen Resultates kann es für sehr wahrscheinlich erklärt werden, daß ein Gemenge von Aminovaleriansäure mit wenig Isoleucin vorlag.

Die von dem für diese Versuche benutzten Kupfersalz abgossene tiefblaue Mutterlauge lieferte beim Verdunsten ein Produkt, welches offenbar gleichfalls ein Gemenge mehrerer Kupfersalze war. Das aus Wasser umkristallisierte Produkt lieferte bei der Analyse folgendes Resultat:

0,1914 g Substanz gaben 0,0494 g CuO = 20,62% Cu.

Auch diese Zahl liegt zwischen den Werten, die den Formeln des aminovaleriansauren Kupfers und des Isoleucinkupfers entsprechen.

Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupfersalze der Aminosäuren von Fraktion II gab bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff eine im Aussehen und im Verhalten mit Leucin übereinstimmende Aminosäure. Ihre wässrige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Die Analyse dieses Produktes gab folgendes Resultat:

0,3724 g Substanz gaben 0,0914 g CuO = 19,61% Cu.

Die Theorie verlangt für Leucinkupfer einen Gehalt von 19,55% Cu.

Die aus Fraktion III erhaltenen Aminosäuren, deren Gewicht nur 1,2 g betrug, lieferten gleichfalls Kupfersalze, von denen

ein Teil in Methylalkohol löslich, ein Teil darin unlöslich war. Die methylalkoholische Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in Wasser gelöst, die Lösung sodann zur Kristallisation gebracht. Das in dieser Weise erhaltene, im Aussehen vom aminovaleriansauren Kupfer verschiedene Kupfersalz gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,220 g Substanz gaben 0,0538 g CuO = 19,50% Cu.

Das Salz stimmte also im Kupfergehalt mit Isoleucinkupfer überein. Die Quantität, in der wir dasselbe erhielten, war so gering, daß wir damit weitere Versuche nicht anstellen konnten. Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung eine im Aussehen und Verhalten dem Leucin gleichende Aminosäure.

Keine der drei Fraktionen hat somit bei der Verseifung ein einheitliches Produkt geliefert, stets wurden Gemenge mehrerer Aminosäuren erhalten. Man darf auf Grund der im vorigen gemachten Beobachtungen annehmen, daß Gemenge von Leucin, Isoleucin und Aminovaleriansäure vorlagen. Es sei schon hier erwähnt, daß das Gleiche auch für die Fraktionen gilt, die bei der Untersuchung der aus den Keimpflanzen von *Lupinus albus* dargestellten Aminosäuren in entsprechender Weise erhalten wurden (man vergleiche die weiter unten folgenden Angaben).

Aus Fraktion IV, deren Gewicht nur 3,4 g betrug, wurde Phenylalanin erhalten, gemengt mit einer anderen Substanz, die sich jedoch durch Extraktion mit Alkohol entfernen ließ. Das in dieser Weise gereinigte Phenylalanin wurde mit Hilfe seiner Reaktionen identifiziert: seine Quantität war sehr gering.

Aus den 8—9 tägigen Keimpflanzen von *Vicia sativa* konnte also außer den früher schon darin nachgewiesenen Monoaminosäuren, nämlich Leucin, Aminovaleriansäure und Phenylalanin, auf dem von uns eingeschlagenen Wege nur noch Isoleucin erhalten werden. Unter den aus diesem Material dargestellten Aminosäuren prävalierte der Menge nach das Leucin. Aminovaleriansäure schien in größerer Menge vorhanden zu sein, als Isoleucin. Phenylalanin wurde, wie oben schon erwähnt ist, nur in sehr kleiner Quantität erhalten.

Über das Resultat, das wir bei Untersuchung dieser Keimpflanzen auf Tryptophan erhielten, wird weiter unten berichtet.

B. 18—20tägige etiolierte Keimpflanzen von *Lupinus albus*.

Die in den Keimpflanzen von *Lupinus albus* sich vorfindenden Aminosäuren sind früher schon untersucht worden.¹⁾ Aus 6—7tägigen Pflänzchen solcher Art konnte leicht Leucin isoliert werden; daneben fand sich Tyrosin in kleiner Menge vor. In 2—3 wöchentlichen etiolierten Pflänzchen fand man Leucin, Aminovaleriansäure und Phenylalanin. Die beiden zuletzt genannten Aminosäuren lassen sich am leichtesten isolieren, wenn man nur die nach Abtrennung der Cotyledonen noch übrig bleibenden Teile der Pflänzchen, in denen Leucin nur in sehr kleiner Menge enthalten ist, für die Darstellung verwendet; verarbeitet man die ganzen Keimpflanzen, so erwächst für die Isolierung jener Aminosäuren eine Schwierigkeit aus dem ziemlich beträchtlichen Leucingehalt der Cotyledonen. In letzterem Falle gelang es nicht, reine Aminovaleriansäure darzustellen. Phenylalanin konnte durch Fällung mit Phosphorwolframsäure isoliert werden. Es war nun zu prüfen, ob mit Hilfe der Estermethode noch andere Aminosäuren sich nachweisen ließen.

Für die Veresterung verwendeten wir 123 g des rohen Aminosäurengemenges, dargestellt nach der oben im Abschnitt A beschriebenen Methode aus einem Quantum von ca. 11 kg lufttrockner etiolierter Keimpflanzen, die nach einer Vegetationsdauer von 18—20 Tagen geerntet worden waren. Da Pflänzchen von solchem Alter in Wasser und in Weingeist lösliche Kohlenhydrate nur noch in geringer Menge enthalten, so blieb bei Darstellung der Aminosäuren eine viel geringere Quantität von Mutterlauge übrig, als bei Darstellung der Aminosäuren aus 8—9tägigen Wickenkeimpflanzen. Ein Teil dieser Mutterlauge wurde für die Darstellung von Estern verwendet; doch wurde dabei nur ein kleines Quantum von Estern erhalten.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 411; Bd. XXX, S. 241 und Bd. XXXVIII, S. 199.

Bei der fraktionierten Destillation der aus jenen 123 g des Rohproduktes erhaltenen Ester zeigte sich, daß ein unter 60° übergehendes Produkt nicht vorhanden war. Über den Siedepunkt und die Quantität der verschiedenen Fraktionen gibt die folgende Tabelle Aufschluß:

	Druck	Siedepunkt	Gewicht ¹⁾
I.	14	60°	4
II.	14	60—80°	35
III.	13	80—100°	15
IV.	12	142°	8
V.	12	154°	6
VI.	12	195°	5

Die Fraktion I wurde in der von E. Fischer angegebenen Weise auf Glykokoll geprüft; doch war das Resultat ganz negativ. Die bei Verseifung der Fraktionen II und III erhaltenen Aminosäuren extrahierten wir mit Alkohol, dunsteten das Extrakt ein, wobei Geruch nach Pyrrolidin auftrat, nahmen es wieder in Alkohol auf und fällten es dann mit Äther. Wir erhielten eine geringe Menge einer Substanz, welche α -Pyrrolidinkarbonsäure sein konnte. Sie wurde in das Phenyleyanat, letzteres in das Hydantoin übergeführt. Dieses Produkt schmolz bei 138.5°, während das in entsprechender Weise aus α -Pyrrolidinkarbonsäure entstehende Hydantoin bei 143° schmilzt. Leider erhielten wir jene Substanz nur in so geringer Menge, daß wir sie nicht noch durch Umkristallisieren reinigen konnten; wäre letzteres möglich gewesen, so würde vermutlich der Schmelzpunkt unseres Produktes sich noch etwas erhöht haben. Wir haben somit das Vorhandensein von Pyrrolidinkarbonsäure zwar nicht sicher nachweisen können; für sehr wahrscheinlich aber darf es doch erklärt werden, daß diese Stickstoffverbindung sich vorfand. Ohne Zweifel aber war ihre Quantität eine äußerst geringe.

Es ist hier noch zu erwähnen, daß wir auch die von dem rohen Aminosäurengemenge abfiltrierte Mutterlauge, von der

¹⁾ Das Gesamtgewicht der Fraktionen betrug unter Hinzurechnung des bei der Destillation verbliebenen Rückstandes 83 g. Bei der Ueberführung des Aminosäurengemenges in die Ester hatten einige Verluste stattgefunden.

wir, wie oben schon erwähnt wurde, einen Teil verestert haben, auf Pyrrolidinkarbonsäure untersuchten. Doch haben wir einen sicheren Nachweis dieser Stickstoffverbindung hier nicht erbringen können.

Über die Art und Weise, in der wir die aus den Fraktionen I bis III erhaltenen Aminosäuren weiter behandelten, ist folgendes anzugeben:

Fraktion I. Die Aminosäuren dieser Fraktion wurden in die Kupfersalze übergeführt, letztere sodann bei Zimmertemperatur mit Methylalkohol behandelt, bis dieses Lösungsmittel nur noch eine äußerst geringe Substanzmenge aufnahm. Ungelöst blieb eine sehr geringe Menge eines Kupfersalzes, das bei der Zerlegung eine im Verhalten mit Leucin übereinstimmende Aminosäure lieferte. Die methylalkoholische Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in Wasser gelöst, die Lösung zur Kristallisation eingeeengt. Wir erhielten so ein im Aussehen dem aminovaleriansäuren Kupfer gleichendes Kupfersalz. 0,3070 g des aus Wasser umkristallisierten Salzes gaben bei der Analyse 0,0825 g CuO = 21,47% Cu. (Die Theorie verlangt für aminovaleriansäures Kupfer den gleichen Kupfergehalt.)

Fraktion II. Die aus dieser Fraktion erhaltenen Aminosäuren wurden, nachdem sie zur Entfernung etwa vorhandener α -Pyrrolidinkarbonsäure mit Alkohol extrahiert worden waren, in die Kupfersalze übergeführt. Letztere extrahierten wir mit Methylalkohol, ohne jedoch diese Extraktion solange fortzusetzen, bis nichts mehr in Lösung ging. Die methylalkoholische Lösung wurde abfiltriert, der ungelöst gebliebene Teil der Kupfersalze mit Wasser behandelt, wobei eine stark blau gefärbte Lösung entstand. Dieselbe wurde vom Ungelösten abfiltriert und sodann eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt. Der größte Teil dieses Rückstandes löste sich nach und nach auf, zurück blieb eine kleine Menge eines Kupfersalzes, welches bei der Zerlegung eine dem Leucin gleichende Aminosäure gab. (Der Stickstoffgehalt der letzteren wurde gleich 11,10% gefunden.)

¹⁾ Analytische Belege: 0,2730 g Substanz gaben 27,4 ccm Gas bei 725 mm Druck und 17° C. = 0,03031 g oder 11,1% N.

(wahrscheinlich lag Leucin vor, dem noch ein wenig Aminovaleriansäure beigemischt war). Die von diesem Kupfersalz abfiltrierte methyalkoholische Lösung wurde der Destillation unterworfen, das dabei zurückbleibende Kupfersalz mittels Schwefelwasserstoff zerlegt, die so erhaltene Aminosäure zur Kristallisation gebracht und dann noch einmal aus Wasser unter Zusatz von etwas Weingeist umkristallisiert. Dieselbe bestand aus glänzenden Kristallblättchen, die sich beim Erhitzen im Glasröhrchen ohne Hinterlassung eines Rückstandes verflüchtigten. Die Analyse gab folgendes Resultat:

0,2222 g Substanz gaben 24,8 ccm Stickstoffgas
bei 720 mm Druck und 18° C. = 0,02711 g oder 12,14% N.

Der Formel der Aminovaleriansäure entspricht ein Stickstoffgehalt von 10,98%.

Ein aus dieser Aminosäure dargestelltes Kupfersalz gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,2770 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 0,0734 g CuO
= 21,17% Cu.

Die Formel des aminovaleriansauren Kupfers verlangt 21,47% Cu.

Die im vorigen mitgeteilten Versuchsergebnisse berechtigen uns, die in der beschriebenen Weise erhaltene Aminosäure für Aminovaleriansäure zu erklären.

Der in Methylalkohol und in Wasser unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff eine im Aussehen und im Verhalten mit Leucin übereinstimmende Aminosäure. Ihre heiße wässrige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine kristallinische, dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Die Analyse dieses Kupfersalzes lieferte folgende Resultate:

1. 0,2150 g Substanz gaben 0,0525 g CuO = 19,50% Cu

2. 0,2100 » » » 0,0510 » » = 19,40% Cu.

Im Mittel wurden 19,45% Cu gefunden, während die Formel des Leucinkupfers 19,55% Cu verlangt.

Aminovaleriansäure und Leucin sind somit in der Fraktion II nachgewiesen worden.

Die bei der ersten Extraktion der Kupfersalze mit Methylalkohol erhaltene tiefblaue Lösung wurde der Destillation unterworfen; nachdem etwa die Hälfte des Methylalkohols über-

destilliert war, ließ man die rückständige Flüssigkeit erkalten. Aus derselben schied sich ein blaues Kupfersalz in beträchtlicher Quantität aus. In der davon abgegossenen Mutterlauge konnte Isoleucin enthalten sein. Das beim Verdunsten dieser Mutterlauge zurückbleibende Kupfersalz wurde daher mittels Schwefelwasserstoff zerlegt, die dabei erhaltene Aminosäure zur Kristallisation gebracht und analysiert. Die Stickstoffbestimmung gab folgendes Resultat:

0.1610 g Substanz gaben 17.4 ccm Gas bei 722 mm Druck und 17° C.
= 0.019164 g oder 11.91% N.

Der Stickstoffgehalt dieses Präparates erreichte also fast denjenigen der Aminovaleriansäure. Daß aber auch Isoleucin nicht ganz fehlte, wird durch das Resultat wahrscheinlich gemacht, welches wir bei Analyse eines aus der methylalkoholischen Lösung erhaltenen, dann noch aus Wasser umkristallisierten Kupfersalzes erhielten. In diesem Kupfersalz wurden nämlich 20,78% Cu¹⁾ gefunden — eine Zahl, die hinter dem Kupfergehalt des aminovaleriansauren Kupfers (21,47%) nicht unbedeutend zurückbleibt.

Die Fraktion II enthielt also Aminovaleriansäure und Leucin, vielleicht auch etwas Isoleucin. Ohne Zweifel war Aminovaleriansäure diejenige Aminosäure, welche der Quantität nach in dieser Fraktion prävalierte.

Fraktion III. Die beim Verseifen dieser Fraktion erhaltenen Aminosäuren wurden, nachdem sie zur Entfernung der α -Pyrrolidinkarbonsäure mit Alkohol extrahiert worden waren, in die Kupfersalze übergeführt, letztere sodann mit Methylalkohol extrahiert, bis dieses Lösungsmittel nur noch eine sehr geringe Substanzmenge aufnahm. Die methylalkoholische Lösung wurde durch Abdestillieren eines Teils des Lösungsmittels konzentriert, worauf eine Ausscheidung von Kupfersalz erfolgte. Die von letzterem abgegossene Mutterlauge wurde eingedunstet, das dabei zurückbleibende Kupfersalz durch Schwefelwasserstoff zerlegt, die so erhaltene Aminosäure zur Kristallisation gebracht. Die Analyse dieses Produktes gab folgendes Resultat:

¹⁾ Analytische Belege: 0.2146 g Substanz gaben 0,0558 g CuO
= 20,78% Cu.

0.1859 g Substanz gaben 19.4 ccm Stickstoffgas
bei 723 mm Druck und 15° C. = 0.0216 g oder 11.62% N.

Diese Zahl liegt dem Stickstoffgehalt der Aminovaleriansäure weit näher als demjenigen des Isoleucins: wahrscheinlich lag also ein Gemenge von Aminovaleriansäure mit wenig Isoleucin vor.

Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupfersalze lieferte bei der Zerlegung eine im Aussehen und Verhalten dem Leucin gleichende Aminosäure. Ihre heiße wässrige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Die Analyse dieses Produktes gab folgendes Resultat:

0.2220 g Substanz gaben 0.0545 g CuO = 19.60% Cu.

Die Theorie verlangt für Leucinkupfer einen Gehalt von 19.55% Cu.

Wie aus den im vorigen gemachten Angaben zu erschen ist, lieferte auch hier, ebenso wie bei Untersuchung der aus Wickenkeimpflanzen dargestellten Aminosäuren, keine der drei ersten Fraktionen der Ester bei der Verseifung ein einheitliches Produkt: stets wurde ein Gemenge von Aminosäuren erhalten. Daß in diesem Gemenge neben Aminovaleriansäure und Leucin auch Isoleucin sich vorfand, darf für wahrscheinlich erklärt werden, obwohl die Isolierung der zuletzt genannten Aminosäure nicht gelang.

Die IV. Fraktion der Ester, verarbeitet nach der von E. Fischer gegebenen Vorschrift, lieferte Phenylalanin. Letzteres wurde mit Hilfe seiner Reaktionen, sowie durch Analyse seines Kupfersalzes identifiziert:

0.2798 g Substanz gaben 0.0568 g Kupferoxyd = 16.22% Cu.

Die Theorie verlangt für Phenylalaninkupfer einen Gehalt von 16.2% Cu.

Auch die Fraktionen V und VI lieferten Phenylalanin. Doch war dasselbe nicht ganz rein; wahrscheinlich war ihm etwas Asparaginsäure beigemengt. Die Ausbeute an Phenylalanin betrug im ganzen ungefähr 7 g.

Aus dem bei der Destillation der Ester verbliebenen Rückstand, dessen Gewicht 10 g betrug, ließen sich kristallisierte Substanzen nicht gewinnen.

Aus den Keimpflanzen von *Lupinus albus* ließ sich also auf dem von uns eingeschlagenen Wege α -Pyrrolidinkarbon-

säure in sehr kleiner Menge gewinnen: das Vorhandensein von Isoleucin konnte wahrscheinlich gemacht, aber nicht sicher bewiesen werden. Im übrigen konnten wir nur drei aus den genannten Keimpflanzen früher schon dargestellte Monoamino-säuren isolieren, nämlich Aminovaleriansäure, Leucin und Phenylalanin. Der Menge nach prävalierte ohne Zweifel die zuerst genannte Aminosäure: die Ausbeute an Leucin war kaum größer, als diejenige an Phenylalanin. Der Gehalt der Pflänzchen an Isoleucin kann nur relativ gering gewesen sein.

C. Untersuchung der Keimpflanzen auf Tryptophan.

Zur Untersuchung auf Tryptophan dienten vorzugsweise 8—9tägige Keimpflanzen von *Lupinus albus*. Sie wurden in frischem Zustand verarbeitet: für einen Versuch diente ein Quantum von 1750 g, für einen zweiten ein solches von 4,50 kg der frischen Pflänzchen.¹⁾ Dieselben wurden unter Zusatz von wenig Wasser zerkleinert, dann zur Gewinnung des Saftes mit Hilfe einer kräftig wirkenden Presse ausgepreßt. Die in solcher Weise gewonnene Flüssigkeit versetzten wir sofort mit Bleiessig: das Filtrat vom Bleiniederschlag wurde durch Zusatz von Schwefelsäure vom Blei befreit, dann mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß der Gehalt der Flüssigkeit an dieser Säure fast 5% betrug. Hierauf setzten wir Quecksilbersulfat in kleinen Anteilen zu. Dieses Reagens erzeugte in der Flüssigkeit einen schwach gelblichen, nicht sehr voluminösen Niederschlag, der nach Verlauf von 1—2 Tagen abfiltriert, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, dann in Wasser verteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Flüssigkeit befreiten wir durch schwaches Erwärmen, bezw. Durchblasen von Luft vom Schwefelwasserstoff: dann wurde sie mit Hilfe von Baryt von der Schwefelsäure befreit. Die vom Baryumsulfat abfiltrierte Lösung gab mit Glyoxalsäure und Schwefelsäure sehr stark die Tryptophanreaktion (intensiv rote, später in violett übergehende Färbung). Diese Lösung wurde nun unter Zusatz von Alkohol bei gelinder

¹⁾ Der Trockensubstanzgehalt solcher Pflänzchen ist nicht hoch: er beträgt in der Regel höchstens ca. 10%.

Wärme stark eingengt, dann unter eine Glasglocke über konzentrierte Schwefelsäure gestellt. Ein Teil der gelösten Substanz schied sich in fester Form aus, der größte Teil aber blieb sirupös. Es ließ sich leicht erkennen, daß hier nicht reines Tryptophan, sondern ein Gemenge des letzteren mit einer anderen Substanz vorlag. Wir konstatierten, daß die Substanz, welche die Tryptophanreaktion gab, beim Erhitzen mit Weingeist, dem ein wenig Wasser zugesetzt worden war, sich auflöste, während bei dieser Extraktion eine andere, nicht jene Reaktionsgebende Substanz zurückblieb. Da bekanntlich die Reindarstellung des Tryptophans nicht ganz leicht ist, so konnten wir im Hinblick auf jenen Umstand kaum hoffen, aus unserer Lösung kristallisiertes Tryptophan zu erhalten: wir beschränkten uns daher auf die Untersuchung seiner Zersetzungsprodukte. Der beim Eindunsten der erwähnten Lösung verbliebene Rückstand wurde in einem Glaskolben bis zur Zersetzung erhitzt. Dabei trat der Geruch des Skatols auf: doch war ein anderer Geruch beigemischt. Den Inhalt des Glaskolbens behandelten wir nun mit Äther. Die durch Filtration vom Ungelösten getrennte ätherische Lösung gab beim Verdunsten einen stark nach Skatol riechenden Rückstand. Einen Teil dieses Rückstandes lösten wir in Weingeist: ein mit dieser Lösung befeuchteter, dann getrockneter Fichtenholzspahn nahm beim Eintauchen in Salzsäure eine intensive rote, allmählich in violett übergehende Färbung an (Reaktion auf Skatol). Den Rest jenes Rückstands lösten wir in Wasser. Die Lösung nahm beim Versetzen mit Salpetersäure und wenig Natriumnitrit keine Rotfärbung an (Indol fehlte also): dagegen gab sie auf Zusatz jener Reagentien eine weißliche Trübung, wie es für Skatol angegeben wird.

Die im vorigen mitgeteilten Beobachtungen lassen wohl keinen Zweifel darüber, daß in dem durch Quecksilbersulfat im Saft der Keimpflanzen hervorgebrachten Niederschlage Tryptophan sich vorfand.¹⁾

Auch die Keimpflanzen von *Vicia sativa* haben wir auf

¹⁾ Die Identität dieses Produktes mit dem von Hopkins und Cole isolierten Tryptophan ist freilich nicht bewiesen: es wäre möglich, daß ein Isomeres vorläge.

Tryptophan untersucht. Wir verwendeten aber in diesem Falle nicht den aus den Pflänzchen ausgepreßten Saft, sondern die sirupöse Mutterlauge, die nach dem Auskristallisieren des Rohleucins übrig geblieben war (man vergleiche die im Abschnitt A gemachten Angaben). Als diese Mutterlauge mit Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure stark angesäuert und sodann mit Quecksilbersulfat versetzt wurde, entstand ein bräunlich gefärbter Niederschlag. Die aus letzterem bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Lösung war so stark braun gefärbt, daß sie nicht direkt auf Tryptophan geprüft werden konnte. Es zeigte sich jedoch, daß bei fraktionierter Fällung mit Quecksilbersulfat die färbende Substanz größtenteils in den zuerst entstandenen Niederschlag einging: die davon abfiltrierte Flüssigkeit gab auf weiteren Zusatz des Reagens eine viel weniger gefärbte Fällung, die auch bei der Zerlegung durch Schwefelwasserstoff eine nur wenig gefärbte Lösung lieferte. Diese Lösung gab mit Glyoxalsäure und Schwefelsäure Tryptophanreaktion. Der beim Eindunsten dieser Lösung verbliebene Rückstand wurde durch Erhitzen zersetzt, das dabei erhaltene Produkt mit Äther behandelt. Das ätherische Extrakt gab beim Verdunsten einen stark nach Skatol riechenden Rückstand. Somit ist anzunehmen, daß auch in den Wickenkeimpflanzen Tryptophan sich vorfand.

Rückblick auf die Resultate.

In den von uns untersuchten Keimpflanzen konnten wir drei aus solchem Material bisher noch nicht dargestellte Stickstoffverbindungen nachweisen, nämlich α -Pyrrolidinkarbonsäure, Isoleucin und Tryptophan. Doch gelang der Nachweis der α -Pyrrolidinkarbonsäure nur bei *Lupinus albus*; Isoleucin konnte nur aus den Keimpflanzen von *Vicia sativa* isoliert werden, fehlte aber höchstwahrscheinlich auch bei *Lupinus albus* nicht. Außer diesen drei Stickstoffverbindungen konnten wir auf dem von uns eingeschlagenen Wege nur drei früher schon in jenen Keimpflanzen nachgewiesene Aminosäuren, nämlich Aminovaleriansäure, Leucin und Phenylalanin, isolieren.

In den gleichen Keimpflanzenarten sind früher auch Tyrosin, Arginin, Lysin und Histidin nachgewiesen worden. Doch fanden sich diese Stoffe nebeneinander nur in Pflänzchen geringen Alters: aus 2—3 wöchentlichen Pflänzchen war z. B. Tyrosin nicht zur Abscheidung zu bringen. Dies erklärt sich, wenn man annimmt, daß manche der bei der Eiweißspaltung entstehenden primären Produkte im Stoffwechsel der Pflänzchen bald umgewandelt werden. Für diese Annahme sprechen auch wieder die jetzt von uns an *Lupinus albus* gemachten Beobachtungen. Wenn man aus 6—7tägigen Keimpflanzen dieser *Lupinus*-art Aminosäuren darstellt und dieselben näher untersucht, so findet man, daß vorzugsweise Leucin vorhanden ist; zwei- bis dreiwöchentliche etiolierte Keimpflanzen der gleichen Art liefern dagegen ein Aminosäurengemenge, in welchem neben Aminovaleriansäure und Phenylalanin eine relativ geringe Menge von Leucin sich vorfindet, offenbar deshalb, weil ein großer Teil des beim Eiweißzerfall entstandenen Leucins später im Stoffwechsel der Pflänzchen umgewandelt worden ist.

Von den bei der Spaltung der Eiweißstoffe durch Säuren entstehenden Aminosäuren sind einige auch bei der jetzt von uns ausgeführten Untersuchung der Wicken- und Lupinenpflänzchen nicht zum Vorschein gekommen. Als solche sind zunächst Glykokoll, Alanin und Glutaminsäure zu nennen, ferner auch die Oxyaminosäuren, deren Nachweis aber hier vielleicht mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Das Fehlen einzelner Aminosäuren in dem in Keimpflanzen sich vorfindenden Gemenge von Eiweißzersetzungsprodukten läßt sich zwar durch die Annahme erklären, daß manche Stoffe solcher Art bald nach ihrer Bildung umgewandelt werden und sich infolge davon in den zur Untersuchung gelangenden Pflänzchen nur in einer zum Nachweis nicht genügenden Quantität vorfinden; aber man kann jene Erscheinung auch noch in anderer Weise erklären. Man weiß, daß die Eiweißstoffe durch Trypsin auch bei vorhergegangener Einwirkung von Pepsinsalzsäure nicht total in kristallinische Produkte gespalten werden, sondern daß dabei gewisse, der weiteren Verdauung starken Widerstand entgegengesetzte Komplexe übrig bleiben,

die man als Polypeptide bezeichnet. Es ist nun möglich, daß auch in den Pflanzen bei Einwirkung proteolytischer Enzyme auf die Eiweißkörper Stoffe der gleichen oder ähnlicher Art neben Aminosäuren und Hexonbasen sich bilden und daß diese Komplexe dann diejenigen Bausteine der Eiweißkörper einschließen, die in den Keimpflanzen bis jetzt nicht zum Vorschein gekommen sind. Auch das sehr spärliche Auftreten mancher primären Eiweißzersetzungsprodukte, z. B. der Pyrrolidinkarbonsäure, in den Keimpflanzen könnte man unter jener Voraussetzung darauf zurückführen, daß der größte Teil dieser Produkte noch in den gleichzeitig gebildeten Polypeptiden enthalten ist. Es wird eine bei der weiteren Untersuchung der Keimpflanzen noch zu lösende Aufgabe sein, diese Frage zu entscheiden.

Als bemerkenswert kann wohl auch die von uns gemachte Beobachtung gelten, daß aminovaleriansaures Kupfer sich in Methylalkohol ebenso leicht löst wie Isoleucinkupfer und daß daher dieser von F. Ehrlich zur Isolierung des Isoleucins verwendete Alkohol auch bei der Trennung der aus Keimpflanzen darstellbaren Aminovaleriansäure von Leucin gute Dienste zu leisten vermag.