

Bildet sich Homogentisinsäure beim Abbau des Tyrosins in den Keimpflanzen?

Von

E. Schulze und N. Castoro.

(Aus dem agritektur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 29. Juni 1906.)

Die Angabe R. Bertels,¹⁾ daß beim Abbau des Tyrosins in den Keimpflanzen von *Lupinus albus* Homogentisinsäure entsteht, hat vielfach Beachtung gefunden;²⁾ für uns war sie von großem Interesse, weil sie eine Stütze für die Vermutungen zu liefern schien, die E. Schulze³⁾ über das Schicksal der primären Eiweißzersetzungsprodukte im Stoffwechsel der Keimpflanzen ausgesprochen hat. Denn die Bildung von Homogentisin-

¹⁾ Berichte der Deutsch. Botanischen Gesellschaft, 1902, Bd. XX, S. 454—463. Die Umwandlung des Tyrosins wird nach Bertels Annahme durch ein Enzym, nämlich durch die schon länger bekannte Tyrosinase, bewirkt; die dabei entstehende Homogentisinsäure soll dann später durch ein anderes Enzym oxydiert werden.

²⁾ In den Abhandlungen verschiedener Autoren ist Bertels Angabe erwähnt worden. Einen Zweifel an der Bedeutung der Beobachtungen Bertels haben wir nur bei K. Shibata (Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. V, S. 384) gefunden. Dieser Forscher spricht sich folgendermaßen aus: «Neuerdings suchte R. Bertel den Nachweis zu erbringen, daß bei der Oxydation des Tyrosins durch Tyrosinase Homogentisinsäure, NH_3 und CO_2 gebildet werden. Gestützt auf diese Beobachtungen glaubte F. Czapek hierin einen sicher nachgewiesenen Fall von enzymatischer Desamidierung der Aminosäuren erblicken zu dürfen, und das Tyrosinferment sollte nach ihm ebenso gut als eine Oxydase wie als eine Desamidase anzusehen sein. Meine eigene Untersuchung hat jedoch ergeben, daß der ausgiebige Tyrosinumsatz in Bambusschößlingen und anderen wachsenden Pflanzenteilen ganz ohne Beteiligung der Tyrosinase vor sich geht, und demnach erscheint mir das regelmäßige Zustandekommen des Tyrosin-Abbaues durch diese Oxydase ausgeschlossen.»

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 83—85.

säure aus Tyrosin muß unter Sauerstoffaufnahme und unter Abspaltung von Kohlensäure und Ammoniak erfolgen; E. Schulze hat es aber für wahrscheinlich erklärt, daß die primären Eiweißzersetzungserzeugnisse im Stoffwechsel der Keimpflanzen der Oxydation verfallen und daß dabei ihr Stickstoff in Ammoniak übergeführt wird.

Die Beobachtungen, auf welche Bertels Angabe sich gründet, weisen eine Lücke auf; eine Isolierung der Homogentisinsäure aus Keimpflanzen ist von Bertel nicht ausgeführt worden. Wir haben diese Lücke auszufüllen gesucht; das Resultat unserer Versuche war aber völlig negativ.

Über den Weg, den wir einzuschlagen hatten, um jenes Ziel zu erreichen, konnte ein Zweifel nicht bestehen. Wolkow und Baumann,¹⁾ die Entdecker der Homogentisinsäure, haben gezeigt, daß man diese Säure aus dem Alkaptonharn nach Zusatz von Schwefelsäure durch Ausschütteln mit Äther gewinnen kann; aus dem Rückstand, der beim Abdestillieren des Ätherextraktes verbleibt, läßt sich jene Säure krystallisiert erhalten. Nach Garrod²⁾ kann man aber auch zur Reindarstellung der Säure jenen Rückstand in Wasser lösen, die Lösung in der Hitze mit Bleiessig versetzen, die Flüssigkeit der Filtration unterwerfen und das Filtrat der Ruhe überlassen; aus letzterem scheidet sich dann nach dem Erkalten das in Wasser sehr wenig lösliche Bleisalz der Homogentisinsäure in Krystallen aus, aus diesem Salz läßt sich durch Zerlegung mit Schwefelwasserstoff Homogentisinsäure gewinnen. Diese Methoden waren bei der Untersuchung der Keimpflanzen anzuwenden. Auch in dem Falle, daß es nicht gelang, mit ihrer Hilfe die Homogentisinsäure in Krystallen zu erhalten, mußte letztere doch in dem beim Verdunsten des Ätherextraktes verbleibenden Rückstande leicht nachzuweisen sein, da sie charakteristische Reaktionen gibt. Wenn man eine verdünnte wässrige Homogentisinsäurelösung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt, so schwärzt sie sich sofort oder binnen einigen Sekunden unter Ausscheidung

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 277.

²⁾ Hoppe-Seylers Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, bearbeitet von Thierfelder, S. 236.

von Silber; diese Reaktion ist so empfindlich, daß man mit ihrer Hilfe noch Bruchteile eines Milligrammes Homogentisinsäure erkennen kann.¹⁾ Macht man eine wässrige Lösung dieser Säure durch Zusatz von Ammoniak alkalisch und läßt sie dann an der Luft stehen, so färbt sie sich bald dunkel, indem sie sich gleichzeitig trübt; je nach dem größeren oder geringeren Gehalt an der genannten Säure wird die Flüssigkeit zuletzt schwarzbraun oder nur braun; auch diese Reaktion ist sehr empfindlich. Auf Zusatz eines Tropfens Eisenchlorid nimmt eine wässrige Homogentisinsäurelösung eine blaue Färbung an, die jedoch rasch verschwindet. Beim Erwärmen mit Millon'schem Reagens färbt sich die wässrige Lösung der Säure gelb; beim Erkalten scheidet sich ein ziegelroter Niederschlag aus.

Diese von Wolkow und Baumann (loc. cit.) beschriebenen Reaktionen konnten wir aus eigener Anschauung kennen lernen, da wir durch die Güte des Herrn Dr. W. Falta in Basel in den Besitz einer kleinen Quantität von Homogentisinsäure, dargestellt aus Alkaptonharn, gelangten. Dies war für uns von großem Werte; wir waren infolge davon auch imstande, die weiter unten beschriebenen Versuche mit Keimpflanzenextrakten, denen etwas Homogentisinsäure zugesetzt war, zur Ausführung zu bringen.

Es sei hier noch darauf aufmerksam gemacht, daß die Homogentisinsäure, die in alkalischer Lösung sich rasch zersetzt, in freiem Zustande, auch in wässriger Lösung, weit beständiger ist; man hat daher nicht zu befürchten, daß sie während der zu ihrer Abscheidung dienenden Operationen sich zersetzt und infolge davon nicht nachzuweisen ist.

Für den ersten Versuch verwendeten wir die Wurzeln zweitägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus*, die nach Bertels Angabe Homogentisinsäure enthalten sollen. Ein Quantum von

¹⁾ Wir lösten 0,005 g Homogentisinsäure in 10 ccm Wasser. Eine Probe dieser Lösung färbte sich auf Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat sofort schwarz. Dann verdünnten wir $\frac{1}{2}$ ccm dieser Lösung, enthaltend $\frac{1}{4}$ mg Homogentisinsäure, mit Wasser auf 2 ccm. Auch diese höchst verdünnte Lösung färbte sich mit dem genannten Reagens binnen wenigen Sekunden dunkel.

ca. 150 g der frischen Wurzeln wurde rasch zerrieben, unter Zusatz von etwas Wasser¹⁾ auf ca. 90° erhitzt, dann auf ein Seihtuch gebracht, die auf letzterem verbleibende Masse schließlich ausgepreßt. Das Filtrat wurde mit 25 ccm 5% iger Schwefelsäure versetzt, sodann in einem Scheidetrichter mit Äther geschüttelt. Die Trennung des dabei entstandenen ätherischen Auszugs von der wässrigen Schicht ließ sich ohne Schwierigkeit bewerkstelligen.²⁾ Die letztere Schicht wurde dann noch einmal mit Äther durchgeschüttelt, das dabei erhaltene Ätherextrakt mit dem zuerst gewonnenen vereinigt und zugleich mit letzterem der Destillation unterworfen. Dabei verblieb ein nur wenig gefärbter Rückstand, der mit kaltem Wasser behandelt wurde. Die vom Ungelösten abfiltrierte, fast farblose Lösung, deren Volumen nur ca. 10 ccm betrug, wurde im Wasserbade bei gelinder Wärme ein wenig eingeengt und sodann auf Homogentisinsäure untersucht. Sie zeigte folgendes Verhalten:

a) Nach Zusatz von ammoniakalischer Silbernitratlösung färbte sie sich im Verlauf von ca. $\frac{1}{2}$ Minute gelb, während einige weißliche Flocken sich ausschieden; die Färbung ging bei längerem Stehen in braun über, ohne daß eine Trübung der Flüssigkeit erfolgte; die gleich anfangs ausgeschiedenen weißlichen Flocken färbten sich nach und nach dunkel.

b) Nach Zusatz von Ammoniak bis zum Eintreten einer alkalischen Reaktion färbte sich die Flüssigkeit grünlich; eine

¹⁾ Im ersten Versuch setzten wir dem Wurzelbrei etwas mehr als das gleiche Gewicht an Wasser zu; der von den unlöslichen Teilen getrennte Auszug wurde sodann im Wasserbade eingeengt, ehe wir ihn mit Äther und Schwefelsäure schüttelten. In den später ausgeführten Versuchen verringerten wir die dem Wurzelbrei zugesetzte Wassermenge und schüttelten die Extrakte mit Äther und Schwefelsäure, ohne sie zuvor einzuengen.

²⁾ Die im Scheidetrichter vorhandene Flüssigkeit trennte sich nach dem Durchschütteln bald in eine wässrige Schicht und eine darüber befindliche Emulsion. Die wässrige Schicht wurde aus dem Scheidetrichter abgelassen; zu der in letzterem zurückgebliebenen Emulsion setzten wir ein neues Quantum Äther und schüttelten noch einmal durch. Nun erfolgte bald eine Trennung in eine klare ätherische Schicht und eine darunter stehende wässrige, deren Volumen in diesem Falle selbstverständlich nur gering war.

Dunkelfärbung trat auch bei langem Stehen der alkalisch gemachten Probe an der Luft nicht ein.

c) Auf Zusatz von etwas verdünnter Eisenchloridlösung färbte sich die Flüssigkeit bräunlich-violett; eine Veränderung der Färbung trat beim Stehen nicht ein.

d) Mit Millonschem Reagens gab die Flüssigkeit einen weißen Niederschlag; eine Färbung der Flüssigkeit oder des Niederschlags beim Erwärmen erfolgte nicht.*

Daß diese Reaktionen nicht diejenigen der Homogentisinsäure sind, war leicht zu konstatieren, indem wir jener Flüssigkeit eine sehr kleine Quantität der genannten Säure zusetzten und sie sodann wieder untersuchten. Nach Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat schwärzte sie sich nun binnen wenigen Sekunden und wurde undurchsichtig. Mit Ammoniak alkalisch gemacht und sodann der Luft ausgesetzt, färbte sie sich bald braun. Mit Eisenchlorid gab sie eine rasch verschwindende Färbung, die nicht rein blau war, weil ja die Flüssigkeit auch vor dem Zusatz von Homogentisinsäure durch das genannte Reagens bräunlich-violett gefärbt wurde.

In den Wurzeln der zweitägigen Keimpflanzen vermochten wir also auf dem von uns eingeschlagenen Wege Homogentisinsäure nicht nachzuweisen. Dies war uns insofern nicht sehr überraschend, als ja in Keimlingen solchen Alters erst ein sehr kleiner Teil der Reserveeiweißstoffe zerfallen ist und demgemäß auch die Tyrosinbildung nur sehr schwach gewesen sein kann; ist aber erst sehr wenig Tyrosin entstanden, so kann auch der Gehalt der Pflänzchen an Homogentisinsäure nur ein sehr niedriger sein.¹⁾ Für einen zweiten Versuch verwendeten wir daher 6—7 tägige Keimpflanzen der oben genannten Lupinusart. Solche Pflänzchen enthalten schon eine bedeutende Quantität von Eiweißzersetzungsprodukten; aus ihren Kotyledonen läßt sich ohne Schwierigkeit Tyrosin isolieren. Da wir aus dem hypokotylen Glied und aus den Wurzeln diese Aminosäure nicht darzustellen vermochten, so ist es sehr wahrscheinlich, daß

¹⁾ Wobei noch zu berücksichtigen ist, daß nach Bertels Annahme die Homogentisinsäure im Stoffwechsel der Pflänzchen der Oxydation verfällt.

dieselbe in diesen Pflanzenteilen dem Abbau unterliegt. Gesetzt nun, daß dabei Homogentisinsäure sich bildet, so müssen hier für den Nachweis dieser Säure die Verhältnisse weit günstiger liegen, als bei den zweitägigen Keimpflanzen. Für unseren Versuch verwendeten wir 500 g ganz frischer Wurzeln.¹⁾ Dieselben wurden unmittelbar nach der Abtrennung von den Pflänzchen fein zerrieben und sodann ebenso behandelt, wie es oben für die Wurzeln der zweitägigen Pflänzchen angegeben worden ist. Die beim Schütteln des Extrakts mit Äther im Scheidetrichter entstandene ätherische Lösung ließ sich auch hier ohne Schwierigkeit von der wässrigen Schicht trennen. Der nach dem Abdestillieren des Äthers verbliebene Rückstand wurde mit wenig Wasser behandelt. Die vom Ungelösten abfiltrierte Flüssigkeit, welche fast farblos war, wurde im Wasserbade noch ein wenig eingeengt, so daß sie nur ein Volumen von etwa 5 ccm besaß. Bei der Untersuchung dieser Flüssigkeit auf Homogentisinsäure traten die gleichen Erscheinungen ein, wie sie bei der in gleicher Weise aus den Wurzeln der 2-tägigen Pflänzchen gewonnenen Flüssigkeit beobachtet wurden; wir erhielten also nicht die Reaktionen der Homogentisinsäure.

Für einen dritten Versuch verwendeten wir die nach Abtrennung der Wurzeln übrig gebliebenen Teile der 6—7-tägigen Pflänzchen. Diese Teile wurden zerrieben; dann verfahren wir ganz ebenso, wie es im vorigen für die Wurzeln angegeben worden ist. Die Trennung der beim Schütteln des Extraktes mit Äther im Scheidetrichter gebildeten ätherischen Lösung von der wässrigen Schicht ging hier wegen der weit größeren Konzentration des Extraktes nicht so leicht von statten, wie bei dem aus den Wurzeln dargestellten Extrakt; nach längerem Stehen war aber eine Scheidung der anfangs entstandenen

¹⁾ Bei Ausführung dieses, sowie der folgenden Versuche wurden die Wurzeln von den Pflänzchen so abgetrennt, daß mit jeder Wurzel noch ein kleiner Teil des hypokotylen Gliedes verbunden war. Das gleiche gilt für die später beschriebenen Versuche mit chloroformierten Pflänzchen. Dies erschien zweckmäßig, weil nach Bertels Angabe auch im hypokotylen Glied die Sphärite auftreten, die er für Tyrosin und für die Muttersubstanz der Homogentisinsäure hält.

Emulsion so weit erfolgt, daß wenigstens der größere Teil der ätherischen Lösung gewonnen werden konnte. Der beim Abdestillieren dieser Lösung verbliebene Rückstand wurde mit Wasser behandelt, die vom Ungelösten abfiltrierte Flüssigkeit auf Homogentisinsäure untersucht. Das Resultat war das gleiche, wie in den ersten beiden Versuchen; es trat keine Erscheinung auf, die auf das Vorhandensein der genannten Säure zu schließen berechnigte.

Für einen vierten Versuch dienten die Wurzeln 6—7 tägiger Keimpflanzen von *Curcubita Pepo*. Da in diesen Keimpflanzen Tyrosin nachgewiesen worden ist, so schienen dieselben ein günstiges Objekt für die Prüfung auf Homogentisinsäure zu sein. Die Ausführung des Versuches geschah so, wie oben beschrieben worden ist. Das Resultat war auch hier negativ.

Die Versuche mit den Wurzeln 2tägiger und 6—7tägiger Keimpflanzen wurden später von uns wiederholt, ohne daß das Resultat sich änderte.

Ehe wir weitere Versuche anstellten, prüften wir, ob eine geringe, einem Keimpflanzenextrakt zugesetzte Quantität von Homogentisinsäure sich durch Ausschütteln mit Äther unter Zusatz von Schwefelsäure wieder gewinnen ließ. Wir zerrieben 120 g Wurzeln von 2tägigen Keimpflanzen und fügten dem in der oben beschriebenen Weise dargestellten Extrakt ungefähr 0,1 g Homogentisinsäure, außerdem die erforderliche Quantität verdünnter Schwefelsäure zu; dann schüttelten wir die Flüssigkeit im Scheidetrichter mit Äther. Die ätherische Lösung, die auch in diesem Falle sich leicht von der wässerigen Schicht trennte, wurde der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand mit wenig Wasser behandelt, die vom Ungelösten abfiltrierte Flüssigkeit im Wasserbade noch etwas eingengt. Diese Flüssigkeit gab sehr stark die Reaktionen der Homogentisinsäure; nach Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat schwärzte sie sich binnen einigen Sekunden, indem sie zugleich undurchsichtig wurde. Mit Ammoniak alkalisch gemacht und sodann der Luft ausgesetzt, färbte sie sich sehr bald braun; auf Zusatz von Eisenchlorid nahm sie eine, freilich nicht rein blaue Färbung an, die später sich änderte.

In einem zweiten Versuch setzten wir einem aus 60 g Wurzeln unter Hinzufügen von 40 ccm Wasser in der gleichen Weise hergestellten Wurzelextrakt nur 0,02 g Homogentisinsäure zu und verfahren dann ganz ebenso wie im ersten Versuche. Der beim Abdestillieren des Ätherextraktes verbliebene Rückstand lieferte auch in diesem Falle bei der Behandlung mit Wasser eine Lösung, welche die Reaktionen der Homogentisinsäure gab.

In einem dritten Versuche machten wir einen noch geringeren Zusatz von Homogentisinsäure; einem mit Wasser verdünnten Wurzelextrakt, dessen Volumen 50 ccm betrug, fügten wir nur 0,005 g der genannten Säure zu. Eine Probe dieser Flüssigkeit schwärzte sich mit ammoniakalischem Silbernitrat in kurzer Zeit; eine andere Probe, die mit Ammoniak alkalisch gemacht worden war, färbte sich bei Luftzutritt bald dunkel. Wir brachten diese Flüssigkeit sodann durch Zusatz einer neuen Quantität des verdünnten Wurzelextraktes auf 80 ccm. Auch eine Probe dieser noch stärker verdünnten Flüssigkeit schwärzte sich mit ammoniakalischem Silbernitrat; doch dauerte es 30 Sekunden, bis die Reaktion eintrat. Nun wurde das Volumen der restierenden Flüssigkeit durch Zufügen von verdünntem Wurzelextrakt auf 100 ccm gebracht; auch in dieser Verdünnung gab sie noch die Reaktion mit ammoniakalischem Silbernitrat, aber erst nach Verlauf von ca. 1 Minute. In diesen Versuchen gab also die Homogentisinsäure ihr Vorhandensein zu erkennen, auch ohne daß sie zuvor mit Äther ausgeschüttelt worden war. Der nach Ausführung dieser Reaktionen noch übrig gebliebene Teil des mit Homogentisinsäure versetzten Extraktes wurde sodann unter Zusatz von Schwefelsäure im Scheidetrichter mit Äther geschüttelt; in dem beim Abdestillieren des ätherischen Extraktes verbliebenen Rückstande ließ sich leicht Homogentisinsäure nachweisen.

Als wir einer Probe des gleichen, aber nicht mit Homogentisinsäure versetzten Extraktes ammoniakalisches Silbernitrat zufügten, trat erst nach Verlauf von mehr als 5 Minuten eine Färbung ein. Zunächst färbte sich der Extrakt gelb; erst bei noch längerem Stehen wurde die Färbung dunkler. Eine plötz-

lich eintretende Schwärzung und gleichzeitiges Undurchsichtigerwerden des Extraktes, wie es bei den mit Homogentisinsäure versetzten Flüssigkeiten beobachtet wurde, trat hier überhaupt nicht ein, ebensowenig eine Dunkelfärbung einer mit Ammoniak alkalisch gemachten Probe beim Stehen an der Luft. ¹⁾

Für einen vierten Versuch verwendeten wir ein aus den Wurzeln 8tägiger Keimpflanzen gewonnenes Extrakt, welches bedeutend konzentrierter war, als das für den dritten Versuch benutzte; wir setzten diesem Extrakt 0,004 g Homogentisinsäure, gelöst in 8 ccm Wasser, zu. In einer mit ammoniakalischer Silberlösung versetzten Probe dieser Flüssigkeit begann erst nach mehreren Minuten die Reduktion; dann aber schwärzte sich die Probe rasch. Eine mit Ammoniak alkalisch gemachte Probe der gleichen Flüssigkeit färbte sich beim Stehen an der Luft bald braun.

Die im vorigen mitgeteilten Beobachtungen mußten uns zu der Überzeugung führen, daß ein Gehalt eines Keimpflanzenextraktes an Homogentisinsäure, auch wenn derselbe nur gering ist, sich leicht erkennen läßt; auch müssen wir aus ihnen die Schlußfolgerung ableiten, daß die von uns untersuchten Keimpflanzen keine Homogentisinsäure enthielten. Nicht ausgeschlossen bleibt selbstverständlich die Möglichkeit, daß in den Keimpflanzenextrakten nur Spuren von Homogentisinsäure enthalten waren.

¹⁾ Wir haben wiederholt Proben der in früher beschriebener Weise aus den zerriebenen Wurzeln 2tägiger und 6—7tägiger Keimpflanzen dargestellten Extrakte alkalisch gemacht und dann an der Luft stehen gelassen, konnten aber nicht bemerken, daß sie auch bei längerem Stehen braun wurden — was doch auch bei einem nur geringen Gehalt dieser Extrakte an Homogentisinsäure hätte eintreten müssen. Dagegen färbte sich der Wurzelbrei, wenn man ihn unter Zusatz von Chloroform oder auch ohne einen solchen an der Luft stehen ließ, nach Verlauf von einigen Stunden meistens rötlich oder bräunlich, eine Erscheinung, die bekanntlich bei vielen Pflanzenteilen eintritt. Mit der Homogentisinsäure hatte diese Färbung offenbar nichts zu tun; anderenfalls hätte man durch Zusatz von Alkali zum Wurzelbrei das Eintreten der Färbung beschleunigen können; dies gelang aber nicht. Auch würden, falls das Vorhandensein von Homogentisinsäure die Ursache der Färbung gewesen wäre, die aus dem Wurzelbrei dargestellten Extrakte sich nach dem Zusatz von Alkali an der Luft braun färben müssen; dies trat aber nicht ein, wie oben schon mitgeteilt worden ist.

Um kein Mittel zur Darstellung von Homogentisinsäure aus den Keimpflanzen unbenutzt zu lassen, stellten wir unter Verwendung des von Garrod (loc. cit.) angegebenen Verfahrens noch einige Versuche an. 500 g ganz frische Wurzeln von 6—7tägigen Keimpflanzen von *Lupinus albus* wurden zerrieben und sodann in der oben beschriebenen Weise verarbeitet. Den beim Abdestillieren des ätherischen Extrakts verbliebenen Rückstand behandelten wir mit Wasser; die vom Ungelösten abfiltrierte wässrige Lösung, deren Volumen ungefähr 20 ccm betrug, wurde im Wasserbade möglichst stark erhitzt und sodann mit Bleiessig versetzt. Ein dabei entstandener amorpher Niederschlag wurde rasch abfiltriert, das farblose Filtrat einige Tage lang der Ruhe überlassen. In diesem Filtrat bildete sich eine kleine weiße Ausscheidung, die aber wahrscheinlich zum größten Teil aus Bleicarbonat bestand. Sie wurde abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen, zwischen Fließpapier abgepreßt, sodann in Wasser verteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Der vom Schwefelblei abfiltrierten Flüssigkeit fügten wir, nachdem sie im Wasserbade eingeeengt worden war, ammoniakalisches Silbernitrat zu. Es trat keine Reduktion von Silber und keine Dunkelfärbung ein; demnach enthielt diese Flüssigkeit keine Spur von Homogentisinsäure. Hätte letztere Säure sich in dem Ätherextrakt vorgefunden, so hätte in dem von uns ausgeführten Versuche eine Ausscheidung von homogentisinsaurem Blei entstehen müssen.

Ein zweiter, in der gleichen Weise ausgeführter Versuch, für welchen ungefähr die gleiche Quantität von Wurzeln 6- bis 7tägiger Keimpflanzen verwendet wurde, lieferte gleichfalls ein ganz negatives Resultat.

Mit Rücksicht auf Bertels Angabe, daß in chloroformierten Keimpflanzen, sowie in chloroformierten Wurzeln solcher Pflanzen Homogentisinsäure in etwas größerer Menge zu finden sei, war es erforderlich, noch einige andere Versuche auszuführen. Wir brachten 860 g 2—3tägige Keimpflanzen von *Lupinus albus* mit Chloroform und Wasser¹⁾ in ein Becherglas und ließen sie

¹⁾ In unseren Versuchen wendeten wir Chloroform und Wasser meistens im Verhältnis 1 : 10 an.

darin zwei Tage lang stehen. Dann wurden die Wurzeln von den Pflänzchen abgetrennt und in der früher beschriebenen Weise untersucht. Homogentisinsäure vermochten wir darin nicht nachzuweisen; der beim Abdestillieren des Ätherextraktes verbliebene Rückstand gab an Wasser keine Substanz ab, welche die Reaktionen der genannten Säure zeigte.

Zwei andere Versuche mit je 100 g Wurzeln stellten wir in folgender Weise an: Die Wurzeln wurden zerrieben, der Brei mit 200 ccm Chloroformwasser in ein Glaskölbchen gebracht, letzteres mit einem Wattepfropf verschlossen und sodann im Thermostaten auf 35—40° erhitzt. Das Erhitzen wurde in einem Falle zwei Tage, im anderen drei Tage lang fortgesetzt. Dann wurde der Inhalt der Kölbchen in der früher beschriebenen Weise auf Homogentisinsäure untersucht. Das Resultat war auch hier negativ.

Diese beiden Versuche hielten wir von vornherein für aussichtslos. Eine Zunahme der Homogentisinsäure in den Wurzeln infolge des Chloroformierens wäre nur zu erwarten gewesen, wenn, wie Bertel es annimmt, diese Operation eine Steigerung des Tyrosingehalts der Wurzeln bewirkt hätte. Bei den von uns untersuchten Wurzeln der Keimpflanzen von *Lupinus albus* war aber von einer solchen Steigerung nichts zu bemerken, wie aus den in der vorhergehenden Abhandlung von uns gemachten Mitteilung zu ersehen ist. Wir haben daher noch einen dritten Versuch in folgender Weise angestellt: 100 g Wurzeln wurden zerrieben, der Brei nach Zusatz von 0,3 g Tyrosin mit 200 ccm Chloroformwasser in ein Kölbchen gebracht und nun drei Tage lang im Thermostaten auf 35—40° erhitzt. Dann verarbeiteten wir den Inhalt des Kölbchens in der vorher schon beschriebenen Weise. Homogentisinsäure konnten wir darin eben so wenig nachweisen, wie in den ohne Zusatz von Tyrosin für den Versuch verwendeten Wurzeln. Zu erwähnen ist noch, daß der im letzten Versuch bei Verarbeitung des Wurzelbreies erhaltene Extrakt noch Tyrosin enthielt. Derselbe gab beim Erwärmen mit Millonschem Reagens eine rot gefärbte Lösung. Ferner konnten wir aus der nach dem Schütteln mit Äther und Schwefelsäure im Scheidetrichter von dem Ätherextrakt getrennten wässrigen Flüssigkeit leicht Tyrosin zur Ab-

scheidung bringen. Diese Flüssigkeit wurde mit Bleiessig versetzt und sodann filtriert; dem Filtrat vom Bleiniederschlag fügten wir Mercurinitrat zu und stumpten sodann die Acidität der Flüssigkeit durch Zusatz von etwas Natriumcarbonat ab. Der Mercurinitratniederschlag wurde nach einigen Tagen abfiltriert, ausgewaschen, sodann in Wasser verteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Flüssigkeit hierauf mit Ammoniak neutralisiert und im Wasserbade stark eingeengt. Nach dem Erkalten krystallisierte aus dieser Flüssigkeit Tyrosin aus. Dasselbe gab sowohl die Hoffmannsche wie die Piriasche und die Mörnersche Tyrosinreaktion. Die Ausbeute an Tyrosin aus dieser Flüssigkeit betrug 0,02—0,03 g. Wie schon in der vorhergehenden Abhandlung hervorgehoben worden ist, geht das Tyrosin nur partiell in den Mercurinitratniederschlag ein; aus dem Ergebnis unseres Versuches läßt sich also nur schließen, daß während des Versuches das dem Wurzelbrei zugesetzte Tyrosin nicht vollständig umgewandelt worden ist; ob es an Menge abgenommen hatte oder nicht, läßt sich nicht entscheiden.

Auch ein Versuch, in welchem wir den Wurzelbrei unter Zusatz von Tyrosin und von Chloroform 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen ließen und sodann auf Homogentisinsäure untersuchten, gab ein negatives Resultat.

Da Bertel annimmt, daß in der Wurzelspitze ein Enzym enthalten ist, durch welches die Homogentisinsäure oxydiert wird, so stellten wir noch einen Versuch in folgender Weise an: Von den ca. 4 cm langen Wurzeln 2—2¹/₂ tägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* wurden die Wurzelspitzen in einer Länge von ca. 1 cm abgetrennt und entfernt, die übrigen Teile der Wurzeln für den Versuch verwendet. Ein Quantum von 190 g dieses Materials wurde zerrieben, der Brei unter Zusatz von 20 ccm Chloroform und 180 ccm Wasser in ein Becherglas gebracht. Letzteres bedeckten wir mit einer Uherschale und ließen es unter einer Glasglocke 24 Stunden lang stehen. Dann wurde der Inhalt des Glases in eine Schale gebracht und im Wasserbade auf ca. 80° erwärmt, hierauf rasch abgekühlt. Dann trennten wir mit Hilfe eines Sehtuches das Extrakt von den

unlöslichen Teilen und schüttelten es nach Zusatz von 30 ccm 5%iger Schwefelsäure im Scheidetrichter mit Äther. Die von der wässrigen Schicht getrennte ätherische Schicht wurde der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand mit kaltem Wasser behandelt. Die vom Ungelösten abfiltrierte wässrige Lösung, deren Volumen nur ca. 5 ccm betrug, wurde auf Homogentisinsäure untersucht. Eine Probe dieser Lösung gab auf Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat eine der Quantität nach nicht bedeutende weiße Fällung, die durch Filtration sofort beseitigt wurde. Das Filtrat, welchem noch etwas ammoniakalisches Silbernitrat zugefügt wurde, färbte sich im Verlauf von ca. 1 Stunde gelb; eine Schwärzung trat, auch bei längerem Stehen, nicht ein (erst nach 24stündigem Stehen hatten sich darin einige dunkel gefärbte Flocken ausgeschieden). Auch die anderen weiter oben beschriebenen Reaktionen der Homogentisinsäure traten in dieser Flüssigkeit nicht ein.

Endlich stellten wir noch Versuche mit 8tägigen Keimpflanzen von *Lupinus albus* an, welche etwas langsamer gewachsen waren, als die für die bisher beschriebenen Versuche angewendeten Pflänzchen. Ein Quantum von ca. 200 g der von diesen Keimpflanzen abgetrennten Wurzeln wurde sofort zerrieben, der Brei unter Zusatz von etwas Wasser auf ca. 90° erhitzt, dann auf ein Seihtuch gebracht, der auf letzterem verbliebene Zellfaserrückstand nach dem Abfiltrieren des Extraktes ausgepreßt. Das Extrakt wurde nach Zusatz von 30 ccm 5%iger Schwefelsäure im Scheidetrichter mit Äther geschüttelt, die ätherische Lösung abdestilliert, die bei Behandlung dieses Rückstandes mit Wasser resultierende Lösung auf Homogentisinsäure untersucht. Dabei traten, ebenso wie in den früher ausgeführten Versuchen, keine Erscheinungen ein, die auf das Vorhandensein dieser Säure schließen ließen. Wir übergossen nun den auf dem Seihtuch gebliebenen Zellfaserrückstand mit Wasser, setzten 30 ccm 5%iger Schwefelsäure zu, trennten nach ca. 1/2 Stunde die Flüssigkeit vom Ungelösten und schüttelten sie im Scheidetrichter mit Äther. Die ätherische Lösung wurde der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand mit Wasser behandelt. Das Volumen der in dieser Weise er-

haltenen, durch Filtration vom Ungelösten getrennten, farblosen Flüssigkeit betrug nur ca. 5 ccm. Auf Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat färbte sich diese Flüssigkeit erst nach Verlauf von 1—2 Minuten gelb; die Färbung wurde beim Stehen langsam dunkler. Als die Flüssigkeit mit Ammoniak alkalisch gemacht wurde, färbte sie sich schwach violett; selbst bei stundenlangem Stehen unter Luftzutritt ging die Färbung nicht in braun über. Eine Blaufärbung der Flüssigkeit durch Eisenchlorid war nicht zu bemerken. Auch hier also war Homogentisinsäure nicht nachzuweisen.

Eine zweite Portion der gleichen Wurzeln, im Gewicht von ca. 200 g, wurde zerrieben, der Brei nach Zusatz von etwas Wasser und von Chloroform in einem gut bedeckten Bechergläse 24 Stunden lang stehen gelassen. Dann fügten wir dem Brei, ohne ihn zuvor zu erhitzen, 30 ccm Schwefelsäure zu, trennten das Extrakt mittelst eines Seihtuches vom Ungelösten und schüttelten es im Scheidetrichter mit Äther. Der beim Abdestillieren des ätherischen Extraktes verbliebene Rückstand wurde mit Wasser behandelt, die farblose Lösung, deren Volumen nach der Filtration kaum 5 ccm betrug, auf Homogentisinsäure untersucht. Auf Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat gab diese Lösung einen farblosen Niederschlag, der durch Filtration sofort entfernt wurde. Das Filtrat, welchem noch etwas vom Reagens zugefügt wurde, färbte sich nach 1—2 Minuten gelb; die Färbung ging bei längerem Stehen sehr langsam in Braun über. Eine mit Ammoniak alkalisch gemachte Probe der gleichen Flüssigkeit färbte sich beim Stehen an der Luft nicht braun. Von einer Blaufärbung der Lösung durch Eisenchlorid war nichts zu bemerken. Homogentisinsäure war also auch in dieser Lösung nicht nachzuweisen. Es ist bemerkenswert, daß diese Lösung sich mit ammoniakalischem Silbernitrat schwächer färbte als diejenige, die bei Verarbeitung nichtchloroformierter Wurzeln in der gleichen Weise erhalten worden war. Das gleiche gilt auch für den Versuch mit chloroformierten Wurzeln, von denen die Spitze abgetrennt worden war. Falls in den chloroformierten Wurzeln Homogentisinsäure gebildet worden wäre, so hätte die Silberreduktion in den nach

dem beschriebenen Verfahren erhaltenen Lösungen weit stärker und in solcher Weise auftreten müssen, wie dies in Homogentisinsäurelösungen geschieht.

Wir vermochten somit weder in den frischen noch in den chloroformierten Keimpflanzen Homogentisinsäure aufzufinden. Es entsteht nun die Frage, welche Bedeutung gegenüber den negativen Resultaten unserer Versuche den Reaktionen zukommt, auf welche Bertels Angabe sich stützt. Es scheint uns, daß Bertel ein Hauptgewicht auf die durch den Keimpflanzensaft bewirkte Reduktion von ammoniakalischer Silberlösung legt. Wir machen aber darauf aufmerksam, daß die Zahl der silberreduzierenden Substanzen, die in den Organismen auftreten können, nicht gering ist. Wir verweisen auf eine von E. Baumann¹⁾ gegebene Aufzählung solcher Stoffe. Außerdem aber trat die Silberreduktion in den von uns untersuchten Keimpflanzenextrakten, sowie in den wässerigen Lösungen der daraus durch Ausschütteln mit Äther gewonnenen Stoffe in anderer Weise ein, als in einer Homogentisinsäurelösung — worauf wir oben schon aufmerksam gemacht haben. Bertel gibt ferner an, daß er bei seinen Objekten die Reaktionen der Homogentisinsäure mit Eisenchlorid und mit Millonschem Reagens erhalten habe. Wir glauben, daß diese Reaktionen, wenn man sie im Keimpflanzensaft auftreten sieht, mehrdeutig²⁾ sind und daß sie durch das Vorhandensein anderer Saftbestandteile unsicher gemacht werden können. Zur Stütze dieser Ansicht weisen wir darauf hin, daß Substanzen, die mit Millonschem Reagens Färbungen oder Fällungen geben, im Saft der Keimpflanzen niemals fehlen; was das Eisenchlorid betrifft, so nahm

¹⁾ Pflügers Archiv der Physiologie, Bd. XXIX, S. 414.

²⁾ Zur Stütze dieser Behauptung weisen wir darauf hin, daß im Alkaptonharn neben Homogentisinsäure hin und wieder noch eine andere Säure auftritt, welche ganz die gleichen Reaktionen gibt, wie die Homogentisinsäure. Man bezeichnet diese Säure als Uroleucinsäure und glaubt, daß sie eine Dioxyphenylmilchsäure sei (ihre Formel ist $C_9H_{10}O_5$). Doch ist ihre Struktur bis jetzt nicht sicher festgestellt worden; es läßt sich daher auch nicht sagen, ob sie in Beziehung zum Tyrosin steht (man vergl. Hoppe-Seylers Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, bearbeitet von Thierfelder, S. 237).

der Saft der von uns untersuchten Wurzeln auf Zusatz dieses Reagens eine dunkle beständige Färbung an. Sodann weisen wir noch darauf hin, daß wir durch Schütteln mit Äther unter Zusatz von Schwefelsäure aus den Keimpflanzenextrakten keine Stoffe gewinnen konnten, welche die hier in Frage stehenden Reaktionen gaben. Endlich sagt Bertel noch, daß ihm auch die Darstellung des Äthylesters der Homogentisinsäure gelungen sei. Das begreifen wir nicht recht, da in Bertels Abhandlung von einer Abscheidung der Homogentisinsäure aus den Keimpflanzen nicht die Rede ist; auch gibt Bertel nicht an, wie jener Ester dargestellt und in welcher Weise er mit Homogentisinsäureester identifiziert wurde. Wir werden in bezug auf diese Punkte einer besseren Belehrung nicht unzugänglich sein; aber wir müssen einstweilen im Hinblick auf die negativen Ergebnisse unserer Versuche an dem Vorhandensein von Homogentisinsäure in den Keimpflanzen zweifeln.
