

Mitteilung aus dem Biochemischen Institut Helsinki

## Vorkommen und Bedeutung der Oxalessigsäure in grünen Pflanzen

Von Artturi I. Virtanen, A. A. Arhimo†\*), Jac. Sundman  
und L. Jännes

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 3. Dezember 1942)

Die Aminodicarbonsäuren haben infolge der in den 1930er Jahren gemachten Entdeckungen zentrale Bedeutung in der biologischen Aminosäuresynthese erlangt und die Ergründung der Entstehungsweise dieser Aminosäuren hat darum besondere Wichtigkeit in der biochemischen Forschung.

In diesem Zusammenhang war eine Beobachtung aus diesem Laboratorium<sup>1)</sup> von Bedeutung, nach welcher in sterilen Kulturen von Leguminosenpflanzen die Asparaginsäure als äußerst gute Stickstoffnahrung wirkt — bei Rotklee besser als Nitratstickstoff, bei der Erbse ungefähr gleichwertig. Da die Leguminosen normalerweise ihren Stickstoff durch die Stickstoffbindung erhalten, welche die in den Wurzelknöllchen wirkenden Leguminosenbakterien verursachen, und da nach unseren Untersuchungen aus den Wurzelknöllchen reichlich N-Verbindungen in den Nährboden übergehen, die hauptsächlich aus l-Asparaginsäure<sup>2)</sup> und dem daraus

\*) Mag. phil. Leutnant A. A. Arhimo fiel im Alter von 28 Jahren am 16. Februar 1940 in heldenhaftem Kampf gegen die ungeheure Übermacht der Russen in Taipale am Vuoksistrom. Dank dem stählernen Willen und der ungebrochenen Schlagkraft unserer geringzähligen Truppen hielt die Verteidigungslinie von Taipale den ganzen Winterkrieg hindurch stand. Ehre jenen Männern! — Mag. Arhimo zeigte sich während einer 1½-jährigen Mitarbeiterschaft als vielversprechender, eifriger junger Forscher, in welchen große Hoffnungen gesetzt wurden. † A. I. Virtanen.

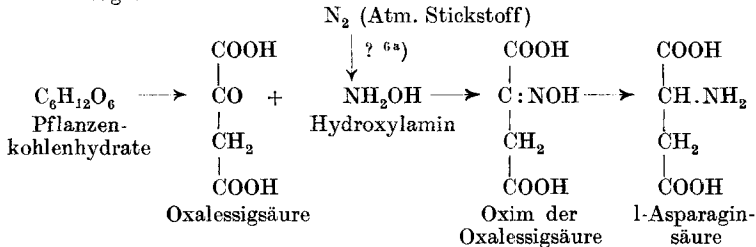
<sup>1)</sup> A. I. Virtanen u. S. v. Hausen, Biochem. Z. 232, 1 (1931); A. I. Virtanen, S. v. Hausen u. H. Karström, Biochem. Z. 258, 106 (1933).

<sup>2)</sup> A. I. Virtanen, T. Laine u. S. v. Hausen, Suomen Kemistilehti Abt. B 9, 1 (1936); A. I. Virtanen u. T. Laine, Suomen Kemistilehti Abt. B 10, 32 (1937).

weiter durch Decarboxylation hervorgehenden  $\beta$ -Alanin<sup>3)</sup> bestehen, war die Auffassung experimentell erhärtet, daß die Asparaginsäure die erste bei der biologischen Bindung des Stickstoffs entstehende Aminosäure (nach Virtanen die „Grundaminosäure“, aus welcher weiter die anderen Aminosäuren entstehen) ist und daß die Leguminosen dieselbe als ihre Stickstoffnahrung benutzen. Das vorzügliche Gedeihen der Leguminosen ohne N-Düngung mit Hilfe von wirksamen Knöllchenbakterien stand mit dieser Auffassung in Einklang.

Weitere Untersuchungen über die Entstehungsweise der Asparaginsäure in den Wurzelknöllchen zeigten, daß weder die Leguminosenbakterien noch die Wurzelknöllchen Aspartaseenzym enthalten, welches die Reaktion: Fumarsäure +  $\text{NH}_3 \rightleftharpoons$  l-Asparaginsäure katalysiert, so daß eine Bildung der Asparaginsäure aus Fumarsäure und Ammoniak nicht möglich schien. Die am nächsten in Frage kommende Bildungsweise der Asparaginsäure schien die bekannte Aminosäuresynthese nach Knoop aus Ammoniak und der entsprechenden Ketosäure, in diesem Falle also aus Oxalessigsäure über die Iminosäure, zu sein.

Bei näherer Untersuchung der Sekretionsprodukte der Wurzelknöllchen wurde unter denselben auch ein wenig Nitrit-N gefunden, welcher aus irgendeiner organischen N-Verbindung zu entstehen schien. Endres<sup>4)</sup> fand nun um diese Zeit Oxim-N in Azotobacterkulturen und analogerwise konnten wir Oxim-N auch unter den Sekretionsprodukten der Wurzelknöllchen feststellen<sup>5)</sup>. Später konnte das Oxim isoliert und als Oxim der Oxalessigsäure identifiziert werden<sup>6)</sup>. Auf Grund dieser Beobachtungen schien es offensichtlich, daß bei der Stickstoffbindung als Zwischenprodukt Hydroxylamin entstand, welches mit Oxalessigsäure das entsprechende Oxim bildete. Als Reduktionsprodukt des Oxims entstand die Asparaginsäure. Der Verlauf der Reaktion wurde darum folgendermaßen dargestellt:



<sup>3)</sup> A. I. Virtanen u. T. Laine, Suomen Kemistilehti Abt. B 10, 2 (1937); Enzymologia [Den Haag] 3, 266 (1937).

<sup>4)</sup> Liebigs Ann. Chem. 518, 109 (1935).

<sup>5)</sup> A. I. Virtanen u. T. Laine, Suomen Kemistilehti Abt. B 9, 5, 12 (1936).

<sup>6)</sup> A. I. Virtanen u. T. Laine, Nature 142, 165 (1938).

<sup>6a)</sup> Der Oxydierungsweg ist mehr wahrscheinlich als die Hydratisierung (A. I. Virtanen, Vortrag am 2. November 1940 in der Versammlung der Soc. pro Fauna et Flora Fennica, Helsinki).

Die Frage, wie die Synthese der anderen Aminosäuren aus der Asparaginsäure vor sich geht, trat in eine neue Phase, nachdem Braunstein und Kritzman<sup>7)</sup> 1937 zeigten, daß im tierischen Organismus durch Vermittlung der Aminodicarbonsäuren eine Umaminierung stattfindet und auf diesem Wege aus den  $\alpha$ -Ketosäuren andere Aminosäuren entstehen. Virtanen und Laine<sup>8)</sup> stellten fest, daß die Umaminierung auch in grünen Pflanzen erfolgt, wodurch die Bezeichnung der Asparaginsäure als Grundaminosäure recht plausibel wird. Es ist bemerkenswert, daß bei der symbiotischen N-Bindung keine Entstehung von Glutaminsäure nachgewiesen werden konnte, obgleich die Glutaminsäure bei der Umaminierung als Grundaminosäure wie auch die Asparaginsäure wirkt und obgleich die Glutaminsäure im allgemeinen quantitativ eine bedeutungsvollere Aminosäure als die Asparaginsäure ist. Als Erklärung für diesen befremdenden Umstand kann das bedeutend geringere Reaktionsvermögen des Hydroxylamins mit Ketoglutarsäure als mit Oxalessigsäure angesehen werden. Nach unseren Bestimmungen ist bei  $p_H = 5,3$  das Reaktionsvermögen des OES ungefähr 3-mal so groß wie dasjenige der Ketoglutarsäure. — Natürlich besteht auch die Möglichkeit, daß die Bildung des Oxalessigsäureoxims die Folge einer Nebenreaktion wäre und die Hauptreaktion über Ammoniak und Oxalessigsäure zur Asparaginsäure führte. Diese Frage kann jedoch an Hand des bisherigen experimentellen Materials nicht entschieden werden. Die Entstehung der Asparaginsäure allein ohne Glutaminsäure als erste Aminosäure scheint für den dargestellten Reaktionsverlauf zu sprechen.

Die zentrale Stellung der Oxalessigsäure bei der Stickstoffbindung — wie auch bei anderen synthetischen Prozessen, wie z. B. bei der Citronensäurebildung<sup>9)</sup> — legt die Frage nahe, in welchem Maße diese Säure in dem Pflanzensaft der grünen Pflanzen, insbesondere der Leguminosen vorkommt. Da es sich selbstverständlich um geringere Mengen dieser sehr reaktionsfähigen Säure handelt, mußte erst ein geeignetes Verfahren zur quantitativen Bestimmung kleiner Oxalessigsäuremengen entwickelt werden. Vor dem Kriege wurden die Verfahren untersucht und vorbereitende Bestimmungen ausgeführt<sup>10)</sup>.

<sup>7)</sup> Nature **140**, 503 (1937).

<sup>8)</sup> Nature **141**, 748 (1938); Biochem. Z. **308**, 213 (1941).

<sup>9)</sup> A. I. Virtanen, Suomen Kemistilehti **1**, 101 (1928); A. I. Virtanen u. L. Pulkki, Suomalaisen Tiedeakatemia Toimituksia [Ann. Acad. Sci. fennicae], Ser. A **33**, Nr. 3 (1930).

<sup>10)</sup> A. I. Virtanen u. T. Laine, Suomen Kemistilehti Abt. B **10**, 35 (1937); A. I. Virtanen, T. Laine u. P. Roine, Suomen Kemistilehti Abt. B **11**, 25 (1938); A. I. Virtanen u. A. A. Arhimo, Nature **144**, 36, 597 (1939); A. I. Virtanen, A. A. Arhimo u. Jac. Sundman, Suomen Kemistilehti Abt. B **14**, 6 (1941).

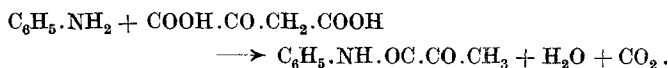
Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse gründen sich, bis auf wenige Ausnahmen, auf Analysen, welche nach dem Winterkrieg, in den Jahren 1940—1941 ausgeführt wurden, wobei besonders die manometrische Methode in ihrer gegenwärtigen Form verwendet wurde.

Die bei der Untersuchung angewandten Verfahren waren

1. Die manometrische Bestimmung der OES unter Anwendung des Anilinverfahrens.
2. Die Bestimmung der OES mittels der Hydrazinmethode.
3. Die Bestimmung der OES mit Hilfe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

### 1. Die manometrische Bestimmung der OES

Das Verfahren basiert auf dem Vermögen des Anilins 1 Molekül  $\text{CO}_2$  von der Oxalessigsäure abzuspalten<sup>11)</sup>:



Hierauf gründend hat Ostern<sup>12)</sup> eine manometrische Methode zur Bestimmung der OES im Warburg-Apparat entwickelt. Die Methode ist nicht vollkommen spezifisch, da auch die anderen  $\beta$ -Ketosäuren  $\text{CO}_2$  durch Einfluß des Anilins abspalten können. Azetessigsäure, welche in der lebendigen Natur vorkommt, gibt viel langsamer  $\text{CO}_2$  ab als die OES und ist dadurch von dieser zu unterscheiden. Azetessigsäure wurde in Leguminosenpflanzen nicht gefunden. Acetondicarbonsäure war ebenfalls in Erbsenpflanzen nicht zu finden. Ascorbinsäure, deren wäßrige Lösung für einige Minuten alkalisch ( $\text{p}_\text{H}$  etwa 13) gemacht worden war, spaltete unter Einfluß des Anilins kein  $\text{CO}_2$ . Dehydroascorbinsäure, durch Jodoxydierung aus Ascorbinsäure hergestellt, spaltet ebenfalls kein  $\text{CO}_2$  durch Einwirkung des Anilins ab. Die in den Pflanzen vorhandene Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure stören somit nicht die manometrische Bestimmung der OES. Weil jedoch die Möglichkeit besteht, daß irgendeine bisher in Pflanzen unbekanntete  $\beta$ -Ketoverbindung auch in der manometrischen

<sup>11)</sup> A. Wohl u. C. Oesterlin, Ber. dtsh. chem. Ges. **34**, 1139 (1901); A. Wohl, Ber. dtsh. chem. Ges. **40**, 2282 (1907).

<sup>12)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **218**, 60 (1933).

Anilinnmethode  $\text{CO}_2$  abgibt, war es wichtig, die Geschwindigkeit der Gasentwicklung bei der OES-Bestimmung an grünen Pflanzen zu verfolgen und mit der Zerfallgeschwindigkeit reiner OES zu vergleichen.

Als versucht wurde, die von Ostern entwickelte Bestimmungsmethode der OES auf Pflanzen anzuwenden, zeigte sie sich ungeeignet, indem die OES zum größten Teil schon aus den Pflanzen verschwindet, wenn diese zwecks Gewinnung des Pflanzensaftes zerrieben werden. Es scheint, daß die beim Zerreiben der Pflanzen stattfindende Zellatmung das Verschwinden der OES bewirkt. Näher wurde diese Erscheinung nicht untersucht.

Bei Versuchen, Mittel zum raschen Unterbinden der Atmung in der Pflanzenmasse zu finden, wurde der wirksame Einfluß eines starken Alkalizusatzes beobachtet. Da die Stabilität der OES nach Straub<sup>13)</sup> jedenfalls bis  $\text{p}_\text{H}$  14 zunimmt, gaben wir der zu untersuchenden, frisch geschnittenen Pflanzenmasse 2 n-NaOH-Lösung so viel zu, daß der durch Zerreiben der Pflanzenmasse mit Quarzsand erhaltene Saft ein  $\text{p}_\text{H}$  von etwa 13 zeigte. Durch diese Maßnahme blieb die OES im Saft erhalten. Von der alkalischen Pflanzensaft zugefügten OES wurden 87—90% der anfänglichen Menge wiedergefunden. Wurde die alkalische Lösung vor der Bestimmung 48 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten, so war die OES schon praktisch genommen verschwunden. Wurde der alkalische Pflanzensaft angesäuert ( $\text{p}_\text{H} = 2,5$ ) und etwa 2 Stunden bei 37° C aufbewahrt oder einen Augenblick gekocht, so erfolgt keine  $\text{CO}_2$ -Bildung bei der manometrischen Bestimmung mehr. Zur Erlangung übereinstimmender Resultate wurden alle vorbereitenden Arbeiten rasch ausgeführt und bei allen Bestimmungen wurde der gleiche „Zeitplan“ eingehalten. Die Einzelheiten der Methode werden im experimentellen Teil beschrieben.

Die Spaltungsgeschwindigkeit des  $\text{CO}_2$  durch Einfluß des Anilins war sowohl bei Verwendung von reiner OES als von Pflanzensaft die gleiche, wie Abb. 1 zeigt. Somit enthält der Pflanzensaft im Licht gewachsener Leguminosen an Verbindungen, welche unter der Einwirkung von

---

<sup>13)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **244**, 120 (1936).

Anilin  $\text{CO}_2$  bilden, offenbar nur Oxalessigsäure. (Im Dunkeln gewachsene Erbsenkeimlinge dagegen enthalten irgend-eine Substanz, welche langsam  $\text{CO}_2$  abgibt. Wir werden an anderer Stelle unsere Versuche mit etiolierten Erbsenkeimlingen anführen.

Die manometrische Anilinmethode in der von uns angewandten Form erlaubt nicht die Bestimmung von OES-Mengen unter  $12 \gamma$  je 1 g Frischpflanze. Bei Versuchen ohne Anilin entsprachen die Druckdifferenzen von 8 verschiedenen Versuchen:  $+12$ ,  $-6$ ,  $-7$ ,  $\pm 0$ ,  $+10$ ,  $+9$ ,  $-11$  und  $-9 \gamma$  OES je 1 g frisches Pflanzenmaterial. Druckdifferenzen unter

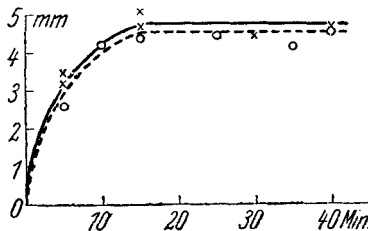


Abb. 1.  $\times$  —  $\times$  Pflanzensaft  $\circ$  - - -  $\circ$  OES in Wasserlösung

2 mm bei unseren Versuchen zeigen mithin noch kein Vorkommen von OES an.

Die OES-Bestimmungen an Erbsen und Klee zu verschiedenen Tageszeiten zeigten, daß die Pflanzen am meisten OES am Mittag und Nachmittag, also zur Zeit der stärksten Beleuchtung, enthalten. Wurden die Pflanzen im Dunkeln gehalten, so ging ihr OES-Gehalt ziemlich rasch herab. Dies geht deutlich aus Tab. 1 hervor.

Aus den Ergebnissen erhellt, daß ein 48-stündiges Halten der Pflanzen im Dunkeln das gänzliche Verschwinden der OES aus den Pflanzen hervorrief. Eine Verdunkelung von 12 Stunden setzte die OES-Menge bereits um 75% in bezug auf die 8 Stunden lang belichteten Pflanzen herab. Folglich schwankt der OES-Gehalt der Pflanzen beträchtlich mit der Tageszeit und zwar ist er morgens am niedrigsten.

Das Entwicklungsstadium der Pflanzen beeinflußt ihren OES-Gehalt sehr stark. In Erbsenpflanzen, deren Schoten schon voll waren, wurde keine OES gefunden (4 Be-

Tabelle 1

Belichtungsversuche mit Rotklee. Gefäßversuche in Quarzsand, geimpfte Pflanzen, ohne N-Düngung. Üppiger Wuchs, Pflanzen noch nicht in der Knospe. Künstliche Belichtung mit 1000 Watt-Lampe in 15 cm Entfernung. Zu den verschiedenen Versuchen wurden Pflanzen gleicher Größe verwendet

Beleuchtet Stunden	Im Dunkeln Stunden	OES je 1 g frischen Klee $\gamma$
8	—	94
3	—	83
2	—	71
—	2,5	78
—	2,5	46
—	12	23
—	48	0
—	48	0

stimmungen zu verschiedenen Zeiten). Im jungen, starken Wachstumsstadium ist der OES-Gehalt der Pflanzen am höchsten. Dieses Resultat ist deshalb interessant, weil die Zunahme der N-Verbindungen bei den Erbsenpflanzen nach dem Blühen aufhört.

Tab. 2 gibt unsere OES-Bestimmungen an verschiedenen Pflanzen wieder. Die Pflanzen wurden für die Analysen an sonnigen Tagen um die Mittagszeit geschnitten. Alle Pflanzen stammten aus Gefäßversuchen in der Pflanzenabteilung unseres Laboratoriums.

Der OES-Gehalt der Erbse vor der Blüte beträgt nach den vorhergehenden Analysen an sonnigen Tagen etwa 40—70  $\gamma$  je 1 g Frischgewicht, wenn die wahrscheinlichen Verluste während der Behandlung der Materie in Rücksicht gezogen werden<sup>14)</sup>. Der OES-Gehalt des Rotkleees ist etwa zweimal so groß wie derjenige der Erbse.

An Nichtleguminosen sind vorläufig nur wenige Bestimmungen ausgeführt worden. Bei Gerste und Hafer (nur ein Versuch von beiden) konnten keine sicher feststellbaren Mengen OES gefunden werden, bei Timothee dagegen wurde OES gefunden.

<sup>14)</sup> In dem Buch von A. I. Virtanen: Cattle Fodder and Human Nutrition, Cambridge 1938, steht auf S. 19 der Dezimalpunkt versehentlich an falscher Stelle, wodurch der OES-Gehalt der Erbse den 10-fachen Wert erhalten hat.

Tabelle 2

Pflanze	Anzahl	Frischgewicht g	Alter oder Wachstumsstadium der Pflanzen	Datum	Beleuchtung	OES je 1 g frische Pflanzenmasse $\gamma$
Erbse	9	15	42 Tage*)	7. 4. 41	Sonnenlicht	38
"	9	15	42 " *)	7. 4. 41	"	39
"	2	48	Schoten voll	10. 6. 41	"	0
"	2	48	" "	10. 6. 41	"	0
"	5	39	" "	7. 8. 39	"	0
"	5	39	" "	7. 8. 39	"	0
"	3	17	26 Tage**)	3. 1. 41	künstliches Licht	52
"	4	17	27 " **)	4. 1. 41	" "	36
"	4	19	31 " **)	8. 1. 41	" "	36
"	4	19	31 " **)	8. 1. 41	" "	38
"	—	50	i. d. Knospe	25. 11. 40	" "	53
"	—	50	" "	25. 11. 40	" "	46
"	3	19	33 Tage**)	9. 1. 41	" "	35
"	3	19	33 " **)	9. 1. 41	" "	35
"	—	—	49 " *)	30. 12. 40	" "	40
"	—	—	49 " *)	30. 12. 40	" "	60
Pferdebohne	1	23	i. d. Knospe	25. 5. 41	Sonnenlicht	26
Rotklee	1	23	"	25. 5. 41	"	24
"	—	—	} noch nicht in Knospe }	3. 12. 40	2 Std. künstl. Bel.	71
"	—	—		3. 12. 40	3 Std. " "	83
"	—	—		3. 12. 40	8 Std. " "	94
"	—	—		4. 12. 40	6 Std. " "	50
Timothe	—	—	} nichtähren- tragend }	3. 6. 41	Sonnenlicht	43
"	—	—		3. 6. 41	"	35
Gerste	—	—	noch nicht in Blüte	27. 5. 41	"	0
Hafer	—	—	noch nicht in Blüte	25. 5. 41	"	13

\*) Beginnende Blüte.

\*\*) Vor der Blüte.

## 2. Die Bestimmung der OES mittels der Hydrazinmethode

Das Verfahren, welches Szent-Györgyi und Straub<sup>15)</sup> zur Bestimmung der OES in tierischen Geweben und Flüssigkeiten angegeben hat, gründet sich auf die Entstehung der Pyrazolderivate, welche bei der Reaktion zwischen 1,3-Dicarbonylverbindungen und Hydrazin gebildet werden. Die OES geht hierbei in Pyrazolon-3-Carbonsäure über, aus der durch Einwirkung von salpetriger Säure 4-Nitrosopyrazolon-3-Carbonsäure entsteht. Diese bildet in stark alkalischer Lösung

<sup>15)</sup> Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 244, 117 (1936).



durch Tautomerisierung ein Kaliumsalz, welches eine kolorimetrisch verwertbare intensive gelbe Farbe zeigt. Die Methode gibt bei reiner Oxalessigsäurelösung und nach Straub auch mit tierischen Geweben gute Resultate.

Bei grünen Pflanzen erwies sich diese Methode als solche unmöglich, indem es sich herausstellte, daß in den Pflanzen andere Substanzen vorkommen, die beim Arbeiten nach dieser Methode eine gelbe Farbe hervorrufen. Von den untersuchten reinen Substanzen bringt die Fumarsäure eine ähnliche gelbe Färbung hervor wie die OES.

Da OES leicht decarboxyliert wird, indem das Zerfallsoptimum nach Straub bei  $p_H = 2,5$  liegt, wurde versucht, die Methode in der Weise anzuwenden, daß von demselben Pflanzenmaterial zwei Proben genommen wurden. Bei der einen Probe wurde die Hydrazinmethode direkt angewendet, wie im experimentellen Teil näher beschrieben ist, in der anderen Probe wurde die OES zerstört, indem die mit Schwefelsäure auf  $p_H = 2,5$  angesäuerte Masse 3 Stunden bei  $37^\circ C$  gehalten wurde; hiernach verfuhr man wie mit der ersten Probe. Der Unterschied der Extinktionswerte konnte als der OES-Menge entsprechend angesehen werden.

Nach diesem Verfahren wurden in Erbsen- und Kleepflanzen folgende OES-Mengen gefunden (Tab. 3):

Tabelle 3

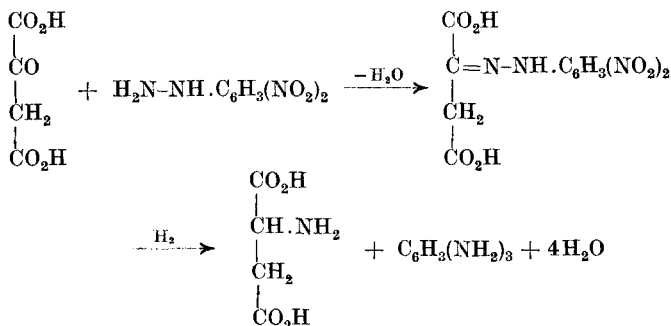
Pflanzenmaterial	Hydrazinmethode		Manometr. Anilinmeth.
	OES je 1 g frische Pflanzen $\gamma$	OES in 1 cem alkalischer Pflanzensaft $\gamma$	OES in 1 cem alkalischer Pflanzensaft $\gamma$
Blühende Erbse, um die Mittagszeit geerntet . . . . .	37	—	—
Blühende Erbse, um die Mittagszeit geerntet . . . . .	32	—	—
Klee vor der Blüte, um die Mittagszeit geerntet . . . . .	—	55	62
Der gleiche Klee + 92 $\gamma$ zugesetzte OES je cem Pflanzensaft . . .	—	142	—

Die OES-Bestimmung an Klee gab mit der Hydrazinmethode einen Wert, welcher dem mittels der manometrischen

Anilinmethode erreichten nahekommmt. Auch die dem Pflanzensaft zugegebene OES wurde mit zufriedenstellender Genauigkeit bestimmt. Mangels mehrerer Bestimmungen wegen des Krieges kann jedoch kein sicheres Urteil über die Eignung der Hydrazinmethode zur Bestimmung der OES in Pflanzenmasse gebildet werden.

### 3. Die Bestimmung der OES mit Hilfe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Wie bereits in einer vorläufigen Mitteilung<sup>16)</sup> erwähnt, ist in unserem Laboratorium versucht worden, zur Bestimmung der Ketosäuren ein Verfahren auszuarbeiten, welches sich auf das Isolieren dieser Säuren aus der Pflanzenmasse als 2,4-Dinitrophenylhydrazone, die Reduktion des erhaltenen Hydrazonmischs mit Natriumamalgam in essigsaurer Lösung nach Tafel<sup>17)</sup> zu den entsprechenden Aminosäuren und die quantitative Bestimmung der gewonnenen Aminosäuren gründet. Die verschiedenen Phasen der Reaktion bei OES können folgendermaßen dargestellt werden:



Die Bestimmung der Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure nach dem oben beschriebenen Prinzip wurde in einer im experimentellen Teil näher angegebenen Weise ausgeführt. Die Ausbeuten an entsprechenden Aminosäuren schwankten stark, von 40—80% der Theorie. Am meisten waren die Ausbeuten um 70%.

<sup>16)</sup> A. I. Virtanen, A. A. Arhimov u. H. Suomalainen, *Nature* **144**, 597 (1939).

<sup>17)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. **19**, 1924 (1886).

Außer dem nichtquantitativen Verlauf der Reduktion von Hydrazonen der  $\alpha$ -Ketosäuren scheint die Ascorbinsäure einigermaßen die OES-Bestimmung zu stören. Bei Versuchen mit reiner Ascorbinsäure wurde festgestellt, daß bei der Reduktion des aus dieser Säure durch Einfluß des 2,4-Dinitrophenylhydrazins gebildeten Niederschlags in sehr geringen Mengen ein Stoff entsteht, der nach der angewandten Methode als Asparaginsäure bestimmt wird. Ob dieses Reduktionsprodukt Asparaginsäure ist, ist nicht untersucht worden. Die Menge desselben beträgt nur etwa 3% der Ascorbinsäure, wodurch die OES-Menge etwas erhöht wird. Die Zunahme beträgt im Falle der bei unseren Bestimmungen gefundenen OES-Mengen etwa 10–15%. Dehydroascorbinsäure würde die OES-Bestimmung bereits entsprechend viel stärker stören, da aber die Ascorbinsäure in grünen Pflanzen fast gänzlich in der reduzierten Form vorkommt, hat die Dehydroascorbinsäure keinen größeren Einfluß auf das Resultat.

Die Bestimmung der OES nach der besprochenen Methode ist recht ungenau und unsicher, da die Ergebnisse einerseits durch die unvollkommene Reduktion der Hydrazone zu Aminosäuren herabgesetzt, andererseits wieder durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure erhöht werden. Wir geben trotzdem unsere Resultate wieder (Tab. 4), damit ein Vergleich mit den mittels der anderen von uns angewandten Methoden erzielten Ergebnissen stattfinden kann.

Tabelle 4  
OES-Bestimmungen mit Hilfe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Datum	Pflanze	OES je 1 g frische Pflanzen $\gamma$
10. 7. 39	Blauluzerne vor der Blüte	48
11. 7. 39	„ „ „ „	45
21. 6. 40	Rotklee	38
23. 7. 40	„ „ „ „	38
1. 8. 40	„ „ „ „	35

Die erzielten OES-Werte sind für Rotklee bedeutend niedriger, als die mittels der manometrischen Methode gefundenen. Leider sind nicht mit dem gleichen Pflanzenmaterial Parallelbestimmungen nach beiden Methoden ausgeführt worden.

#### Anhang

##### Die $\alpha$ -Ketoglutarsäure in Leguminosenpflanzen

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure kann in analoger Weise wie diejenige der OES erfolgen, indem die bei der Re-

duktion des Hydrazonniederschlages entstehende Glutaminsäure bestimmt wird. Zuverlässigere Resultate werden jedoch durch Oxydieren des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der Ketoglutarsäure nach Krebs<sup>18)</sup> mit Kaliumpermanganat erzielt. Die hierbei entstehende Bernsteinsäure ist der fortschreitenden Permanganatoxydation gegenüber beständig, während die anderen aus der Reaktion hervorgehenden Säuren weiter oxydiert werden. Dieses Verfahren haben wir in einer im experimentellen Teil näher beschriebenen Weise angewandt. Bei unseren Bestimmungen variierte die KGS-Menge zwischen 0,236—0,688 mg. Die Bernsteinsäure wurde als Silbersalz in alkoholischer Lösung bestimmt. Parallelbestimmungen mit dem gleichen Pflanzensaft haben ziemlich gut untereinander übereinstimmende Werte ergeben, wie Tab. 5 zeigt. Die Ergebnisse waren gleich, ganz unabhängig davon, ob die Pflanzen mit NaOH-Lösung gemischt oder ohne Alkali zerrieben wurden. Die Ketoglutarsäure scheint also viel beständiger als Oxalessigsäure im Pflanzensaft zu sein. Tab. 5 stellt die Resultate der Ketoglutarsäurebestimmungen dar.

Tabelle 5

Datum	Pflanze	KGS je 1 g Frischpflanze $\gamma$
10. 7. 39	Blauluzerne vor der Blüte	60
11. 7. 39	„ „ „ „	54
21. 6. 40	Rotklee „ „ „	47
27. 6. 40	„ „ „ „	55
7. 7. 40	Blauluzerne „ „ „	57
7. 7. 40	„ „ „ „	60
8. 7. 40	Rotklee „ „ „	51
8. 7. 40	„ „ „ „	57
23. 7. 40	„ im vollen Blüte	56
1. 8. 40	„ „ „ „	46
1. 8. 40	„ „ „ „	44
1. 8. 40	„ „ „ „	45

Die am gleichen Tage ausgeführten Bestimmungen sind Parallelbestimmungen mit dem gleichen Pflanzenmaterial.

Da die KGS in den Pflanzen weder in sehr junger Entwicklungsstufe noch im Reifestadium bestimmt wurde, kann

<sup>18)</sup> Biochemic. J. 32, 108 (1938).

über die Schwankungen ihrer Menge während der verschiedenen Wachstumsperioden auf Grund des bisherigen Materials nichts Sicheres gesagt werden.

### Versuche

#### Die manometrische Methode

Die quantitative Bestimmung der OES in Pflanzenmaterial nach der manometrischen Methode wurde folgendermaßen ausgeführt:

Die Pflanzen wurden ein wenig oberhalb der Erdoberfläche abgeschnitten, rasch gewogen, in einen Mörser gebracht in den etwas Quarzsand und je 12 g Pflanzengewicht 5 ccm-2n-NaOH-Lösung zugegeben wurden und zerrieben. Hiernach wurde der Saft durch Tuch gepreßt und der filtrierte Saft mit 2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert. Zu 20 ccm Saft wurden 9 ccm 2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzugefügt. 4—6 ccm des angesäuerten Saftes wurden in ein Warburg-Gefäß gebracht, welches zuvor mit 1 ccm 3n-Acetatpuffer von p<sub>H</sub> = 5 beschickt war. Der Anhang des Gefäßes enthielt 0,05 ccm Anilin und 0,2 ccm Wasser. Die Temperatur des Thermostaten wurde um + 5° C gehalten. Bei den verschiedenen Versuchen herrschte einigermaßen verschiedene Temperatur.

Bei jeder Versuchsreihe wurden zwei Thermobarometer mitgeführt, die im Hauptraum statt des Pflanzensaftes Wasser enthielten. Außerdem schloß sich an die meisten Versuchsreihen ein Versuch mit Pflanzensaft ohne Anilin und an einigen Versuchsreihen ein Versuch mit aufgekochtem (p<sub>H</sub> = 2,5) Pflanzensaft (mit Anilin).

Da die OES bei Zimmertemperatur decarboxyliert wird, bei p<sub>H</sub> = 13 allerdings verhältnismäßig langsam, war es zwecks Erhalts untereinander vergleichender Ergebnisse wichtig, die Pflanzenmasse stets in gleicher Weise und gleich schnell zu behandeln. Der „Zeitplan“ war bei unseren OES-Bestimmungen folgender:

- |   |           |
|---|-----------|
| 1. Abschneiden, Zerreiben und Entsaften der Pflanze   | 8 Minuten |
| 2. Ansäuern des Saftes und Einführen in das Warburg-Gefäß, welches im Thermostaten untergebracht wird | 5 „       |
| 3. Standdauer der Lösung im Thermostaten vor dem Zusetzen des Anilins . . . . .                       | 15 „      |
|   | 6*        |

Ein zwecks Feststellung der Zerfallgeschwindigkeit der OES in alkalischem Pflanzensaft ausgeführter Versuch zeigte, daß bei Befolgung des obigen Zeitplans 87% der dem Pflanzensaft zugesetzten OES wiedergefunden wurden. Zwei Parallelversuche zeitigten das gleiche Ergebnis. Da bei einem anderen Versuch beim Arbeiten nach dem Zeitplan 90% der zugegebenen OES wiedergefunden wurden, kann man sagen, daß etwa 90% der im Pflanzensaft enthaltenen OES bei Anwendung der manometrischen Anilinmethode in oben angedeuteter Weise bestimmt werden, insofern beim Zerreiben der Pflanzen kein zusätzlicher Zerfall der OES stattfindet.

Beim Berechnen der OES-Menge je 1 g Frischgewicht waren die Verhältnisse folgende: 5 ccm saurer Pflanzensaft = 3,45 ccm alkalischer Pflanzensaft = 2,42 g frisches Pflanzenmaterial.

In Tab. 6 wird ein Versuchsbeispiel angeführt. Als Pflanzenmaterial dienten 6 Wochen alte, in der Pflanzenabteilung

Tabelle 6

Warburg-Gefäß Nr.	1	2	3	4	5
Anhang . . . . .	0,05 ccm Anilin 0,2 ccm H <sub>2</sub> O	0,05 ccm Anilin 0,2 ccm H <sub>2</sub> O	0,05 ccm Anilin 0,2 ccm H <sub>2</sub> O	—  0,2 ccm H <sub>2</sub> O	0,05 ccm Anilin 0,2 ccm H <sub>2</sub> O
Hauptraum . . . .	5 ccm H <sub>2</sub> O  1 ccm Acetat- puffer	5 ccm Pflanzen- saft  1 ccm Acetat- puffer	5 ccm Pflanzen- saft  1 ccm Acetat- puffer	5 ccm Pflanzen- saft  1 ccm Acetat- puffer	5 ccm H <sub>2</sub> O  1 ccm Acetat- puffer

Temperatur 5,8° C; Ablesungen in mm

Min.	1	2	3	4	5	2	3	4
0	101,4	101,6	100,8	100,2	100,7	0	0	0
5	104,0	107,0	106,5	101,5	102,6	3,1	3,4	- 1,0
15	104,0	109,0	107,8	101,4	102,7	5,1	4,7	- 1,1
30	108,0	112,0	112,0	105,5	107,5	4,5	4,5	- 1,9
50	101,0	106,0	105,0	98,0	100,3	4,8	4,6	- 1,8
55	103,2	108,0	107,0	100,0	102,5	4,4	4,4	- 2,0

Mittel nach 50 und 55 Minuten | 4,6 | 4,5 | - 1,9

Nr. 2 = 93  $\gamma$  OES/5 ccm Saft = 39  $\gamma$  OES/1 g frische PflanzenNr. 3 = 92  $\gamma$  OES/5 ccm Saft = 38  $\gamma$  OES/1 g frische Pflanzen

unseres Laboratoriums in Quarzsand gezogene Erbsenpflanzen (Concordia). Zum Bewässern wurde die Nährlösung von Hiltner ohne N-Nahrung benutzt. Die Erbsenpflanzen waren mit einem effektiven Leguminosenbakterienstamm geimpft. Zum Versuch wurden in oben beschriebener Weise um die Mittagszeit 2 Pflanzen genommen, deren Frischgewicht 15 g betrug. Die Herstellung des Pflanzensaftes geschah wie oben erwähnt.

Das Verhalten der Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure wurde durch folgende Versuche klargelegt:

- A. 28,7 mg Ascorbinsäure in 10 ccm  $H_2O$  + 5 ccm 2n-NaOH wurden für 8 Minuten stehengelassen, wonach 7 ccm 2n- $H_2SO_4$  zugesetzt wurden. Die Lösung wurde auf 50 ccm aufgefüllt.
1. 2 ccm Ascorbinsäurelösung + 1 ccm Acetatpuffer (ohne Anilin)
  2. 2 ccm Ascorbinsäurelösung + 1 ccm Acetatpuffer + 0,025 ccm Anilin.
  3. 2 ccm  $H_2O$  + 1 ccm Acetatpuffer + 0,025 ccm Anilin.
- B. 43,5 mg Ascorbinsäure in 20 ccm  $H_2O$  wurden mit 4,95 ccm n/10-Jodlösung titriert und auf 50 ccm aufgefüllt. Zu 25 ccm Lösung wurden 10 ccm 2n-NaOH hinzugefügt. Nach 4 Minuten wurde mit 2n- $H_2SO_4$  gesäuert.
1. 5 ccm oxydierte, mit Alkali behandelte Ascorbinsäurelösung + 1 ccm Acetatpuffer + 0,025 ccm Anilin.
  2. 5 ccm oxydierte, nicht mit Alkali behandelte Ascorbinsäurelösung + 1 ccm Acetatpuffer + 0,025 ccm Anilin.
  3. 5 ccm  $H_2O$  + 1 ccm Acetatpuffer + 0,025 ccm Anilin.

Die Druckdifferenzen zwischen den Versuchen 1 und 2 und den Thermobarometern 3 waren:

	A		B	
	1	2	1	2
Nach 5 Minuten	- 0,5	+ 0,5	—	—
„ 15 „	- 0,5	+ 0,5	—	—
„ 39 „	- 0,5	- 0,5	- 2,0	- 1,0
„ 52 „	- 1,0	± 0	- 1,5	- 1,5
„ 70 „	- 1,0	- 0,5	- 1,0	± 0

Die Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure stören somit nicht die Bestimmung der OES im alkalisch behandelten Pflanzensaft.

Die Ergebnisse der OES-Bestimmungen unter verschiedenen Beleuchtungsverhältnissen und bei verschiedenen Pflanzen sind im theoretischen Teil wiedergegeben.

### Die Hydrazinmethode

Bei Anwendung der Hydrazinmethode zu den OES-Bestimmungen wurden dieselben in folgender Weise ausgeführt:

In zwei Mörser wurden gleiche Mengen frisch geschnittenen Pflanzenmaterials abgewogen und beiden 0,2 ccm 2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je 1 g Pflanzenmasse sowie der einen (a) noch dazu 1 ccm Hydrazinreagens (3,5 g Hydrazinchlorhydrat gelöst in 30 ccm Wasser + 100 ccm 96%-iger Alkohol) je 1 g Pflanzenmaterial zugegeben. Beiden Proben wurde Quarzsand beigemischt.

Beide Proben wurden fein zerrieben. Alle Operationen erfolgten mit größtmöglicher Schnelligkeit.

Die Probe (a) wurde quantitativ in einen effektiven Perkolator überführt und mit Äther 36 Stunden extrahiert.

Die Probe (b) wurde quantitativ in einen Erlenmeyerkolben geeigneter Größe gespült und 3 Stunden bei 37° C gehalten. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde die gleiche Menge Hydrazinreagens zugegeben, die der Probe (a) gleich zu Anfang beigefügt worden war; das Ganze wurde gründlich gemischt, quantitativ in den Perkolator überführt und 36 Stunden mit Äther extrahiert.

Beide Ätherlösungen wurden dreimal mit 2%-iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (5—15 ccm) geschüttelt, die Carbonatlösungen mit 2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert (p<sub>H</sub> etwa 2), in einen Meßkolben gebracht und bis zum Strich (25 ccm, bei einigen Versuchen 50 ccm) angefüllt. Beiden Kolben wurde ein aliquoter Teil (15 oder 30 ccm) entnommen, 3 Minuten in Eis gekühlt, mit 0,1 ccm gesättigter NaNO<sub>2</sub>-Lösung je 10 ccm der Lösung beschickt und weiter in Eis 5 Minuten geschüttelt. Hiernach wurde KOH-Reagens (100 g KOH in 60 ccm Wasser), 1 ccm je 3 ccm Lösung zugegeben, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und mit dem Zeiß-Pulfrichschen Stufenphotometer (Lichtfilter S. 43) photometriert.

War die Lösung nach dem Ansäuern der Sodalösung trübe, so wurde sie in dieser Stufe filtriert. Dann wurde auch der Äther mittels Luftstroms entfernt.

Bei den Bestimmungen wurde angenommen, daß die Differenz der Extinktionswerte von Probe (a) und (b) die OES-



Menge zeigt. Die Ergebnisse der Versuche an Pflanzen sind im theoretischen Teil dargestellt.

#### Versuchsbeispiele

Nr. 4. Abgewogen 24,0 g blühende Erbse. Verfahren wie oben beschrieben. Der zur Bestimmung benutzte Aliquot gleich der Hälfte der gesamten Lösung. Darin gefunden 0,440 mg OES, entsprechend 37  $\gamma$  je 1 g frisches Pflanzenmaterial.

Nr. 6. Pflanzensaft (20 ccm) von jungem Klee hergestellt, wie im Zusammenhang mit der manometrischen Methode beschrieben. Säfte angesäuert; der einen Probe sofort Hydrazin zugefügt, der anderen nach 3 Stunden Standdauer bei 37° C. Im übrigen wurde verfahren wie oben dargestellt. In dem zur Messung benutzten Aliquot (15/25) gefunden 0,661 mg OES, entsprechend 0,55  $\gamma$  OES in 1 ccm alkal. Pflanzensaft.

Nr. 7. Verfahren wie in Nr. 6, nur wurden 20 ccm alkalischem Saft 1,84 mg reine OES zugegeben. In dem Aliquot (10/25) gefunden 1,135 mg OES, entsprechend 142  $\gamma$  je 1 ccm alkalischer Pflanzensaft (55  $\gamma$  OES aus der Pflanze + 87  $\gamma$  von der zugesetzten OES). Von der beigegebenen OES wurden somit 95% wieder gefunden.

Bei Versuchen mit reiner OES in Wasserlösung wurden nach der obigen Methode in drei Parallelversuchen folgende Mengen der beigegebenen OES wiedergefunden: Versuch 1: 92%, Versuch 2: 95%, Versuch 3: 95%.

#### Die 2,4-Dinitrophenylhydrazinmethode

100 g unmittelbar vor der Bestimmung geschnittenes Pflanzenmaterial wurde rasch im Mörser mit Quarzsand und 2 n-NaOH-Lösung zerrieben, von letzterer wurde 1 ccm je 3 g Pflanzenmasse zum Unterbinden der Zellatmung beigegeben.

Nachdem die Probe zu einer homogenen Masse gemahlen war, wurde 1 ccm Dinitrophenylhydrazinreagens (5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 100 ccm 5 n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) je 1 g Pflanzenmaterial hinzugefügt, gründlich umgerührt und die Mischung 1 Stunde in Ruhe belassen. Hiernach wurde die Masse mit geglühtem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mindestens 24 Stunden lang getrocknet.

Die trockene Masse wurde quantitativ in einen Soxhletapparat überführt und mit Äther 48 Stunden lang extrahiert. Aus dem Ätherauszug wurden die Hydrazone der Ketosäuren

durch viermaliges Schütteln in 5%-ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung genommen. Bei der ersten Extraktion mußte so viel Bicarbonatlösung verwendet werden, daß dieselbe beim Schütteln basisch blieb; bei den nächsten wurden je 15 ccm  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung benutzt.

Der Bicarbonatauszug, aus dem der Äther durch Hindurchblasen von Luft entfernt war, wurde auf dem Nutsche filtriert und das Filter mit einer geringen Menge frischer  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen, welche dem Filtrat beigelegt wurde.

Dem Filtrat wurde 3 n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugesetzt, bis der  $\text{pH}$ -Wert etwa 1 ccm betrug, wobei die Hydrazone der Ketosäuren auszufallen begannen. Um quantitativ zu sein, mußte die Fällung in der Kälte während mindestens 72 Stunden erfolgen. Besonders das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der OES fällt langsam aus.

Der Niederschlag wurde in einen Asbestsinter (3 G 3) filtriert, mehrfach mit kleinen Mengen 1 n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  gewaschen und im Sinter in 96%-igem Alkohol gelöst. Die Lösung wurde auf ein bestimmtes Volumen (gewöhnlich 100 ccm) aufgefüllt.

Die Reduktion der 2,4-Dinitrophenylhydrazone erfolgte in einer Temperatur von 1—5° C in einem weithalsigen, mit einem effektiven Rührer versehenen Erlenmeyerkolben, in welchen der übriggebliebene Teil der Alkohollösung der Hydrazone überführt wurde. Die Lösung wurde mit 5 ccm Eisessig angesäuert und in kleinen Gaben, so daß die Wasserstoffentwicklung gerade noch im Gange blieb, wurden — unter dauerndem Umrühren — 10—12 g etwa 2,5%-iges Natriumamalgam im Verlaufe von 3—4 Stunden hinzugefügt.

Durch Zusatz von Eisessig (reichlich im Übermaß; im ganzen 40—50 ccm) wurde dafür gesorgt, daß die Reaktionslösung die ganze Zeit über sauer blieb.

Nach Abschluß der Reaktion wurde aus der durch die Reaktionsprodukte des Dinitroanilins rot gefärbten Lösung der Alkohol im Vakuum entfernt. Der auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllte Verdampfungsrückstand ist als solcher bereit zur Verwendung für die Bestimmungen der Asparaginsäure.

Die Asparaginsäure wurde nach Arhimo<sup>19)</sup> unter Anwendung der photometrischen Apfelsäurebestimmungsmethode von Pucher<sup>20)</sup> bestimmt.

Bei näherer Untersuchung der Möglichkeiten zur Bestimmung von OES, Ketoglutarsäure und Brenztraubensäure nach oben beschriebener Methode wurde festgestellt, daß die Reduktion der Hydrazone zu den entsprechenden Aminosäuren in den verschiedenen Versuchen stark variierte. Bei einigen Versuchen wurden Ausbeuten von über 80% erreicht, bei anderen dagegen nur um 50%. Meist betrug die Aminosäureausbeute bei dem oben erläuterten Reduktionsverfahren etwa 70% der theoretischen Menge. Die Ergebnisse sind somit unsicher. Als Versuchsbeispiel wird Nr. 2 dargestellt:

Extinktionskoeffizient	OES im Aliquot ?	OES in 100 g Pflanzen mg	OES je 1 g Pflanzen ?
0,091	48	4,80	48

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Ketoglutarsäure wurde nach Krebs in folgender Weise ausgeführt:

Ein passender aliquoter Teil ( $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{1}{10}$ ) der in oben beschriebener Weise hergestellten Alkohollösung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone wurde in einen kleinen Kolben überführt, der Alkohol im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in einer möglichst geringen Menge 5%-iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gelöst, die Lösung mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert (etwa  $\text{pH} = 1$ ) und mit Kaliumpermanganat oxydiert. Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Ketoglutarsäure wird hierbei zu Bernsteinsäure oxydiert, die gegen weitere Oxydation beständig ist. Die Lösung, aus der der ausgefällte Braunstein entfernt war, wurde quantitativ in einen kleinen Perkolator überführt und mit Äther ausgezogen. Aus dem Extrakt wurde der Äther auf dem Wasserbade verflüchtigt und der Rückstand in einer kleinen Menge 96%-igen Alkohol gelöst. Die alkoholische Lösung wurde mit  $\text{NaOH}$

<sup>19)</sup> Suomen Kemistilehti Abt. B 12, 6 (1939).

<sup>20)</sup> G. W. Pucher, H. B. Vickery u. A. J. Wakeman, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 6, 288 (1934).

neutralisiert und die Bernsteinsäure mittels mit  $\text{AgNO}_3$  gesättigter Alkohollösung ausgefällt. Der Niederschlag wurde filtriert, in verdünnter Salpetersäure gelöst und mit KSCN-Lösung mit Mohrschem Salz als Indikator titriert. Folgende Versuchsbeispiele seien angeführt.

Tabelle 7

Datum	verbrauchte KSCN-Lösung cem	$\alpha$ -Ketoglutarensäure		
		im Aliquot mg	Totalmenge mg	in 1 g Pflanzenmaterial $\gamma$
10. 7. 39	0,64*)	0,299	5,98	60
23. 7. 40	1,44**)	0,556	5,56	56

\*) Die KSCN-Lösung war 0,0064 normal.

\*\*\*) Die KSCN-Lösung war 0,0053 normal.