

fraktion wurde durch eine Dowex I-Säule geschickt. Entsprechend dem Ergebnis eines Vorversuches mit einem Gemisch authentischer Glutamin-, Asparagin- und γ -Hydroxyglutaminsäuren wurden Glutaminsäure und Asparaginsäure mit 0,5 N Essigsäure eluiert und danach die zu bestimmende Aminosäure mit 1 N Essigsäure.

Reduktion mit Jodwasserstoffsäure. Da das auf diese Weise erhaltene Präparat noch eine geringe Menge Asparaginsäure enthielt, wurde die Aminosäure X aus einem mit Butanol-Eisessig-Wasser entwickelten Papierchromatogramm extrahiert. Die Reduktion des papierchromatographisch reinen Materials wurde in einem geschlossenen Glasrohr 4,5 Stdn mit 57 %igem HJ ($d = 1,70$) und rotem Phosphor bei 135–136°C ausgeführt. Nach anschließender Behandlung mit Amberlite IR-120 wurden die Reaktionsprodukte chromatographiert. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, erwies sich das Hauptprodukt als Glutaminsäure. Dieses Ergebnis beweist, dass die zu bestimmende Substanz eine Hydroxyglutaminsäure sein muss.

Vergleich mit β -Hydroxyglutaminsäure. Auf dem mit Butanol-Eisessig-Wasser entwickelten Chromatogramm wandert β -Hydroxyglutaminsäure etwas schneller als γ -Hydroxyglutaminsäure. Die Aminosäure X zeigte den gleichen R_F -Wert wie γ -Hydroxyglutaminsäure und liess sich somit deutlich von β -Hydroxyglutaminsäure unterscheiden.

Aus diesen experimentellen Resultaten lässt sich folgern, dass *Linaria vulgaris* — obwohl in geringer Menge — γ -Hydroxyglutaminsäure enthält.

Herrn Prof. Dr. A. I. Virtanen bin ich für sein Interesse und Wohlwollen zu besonderem Dank verpflichtet, und Fräulein K. Aalto sei bestens für ihre technische Hilfe gedankt.

1. Virtanen, A. I. und Hietala, P. K. *Acta Chem. Scand.* 9 (1955) 175.

Eingegangen am 2. Januar 1962.

Isolierung und Identifizierung von α -Aminoadipinsäure aus Erbsenkeimlingen (*Pisum sativum* L.)

SHIN-ICHI HATANAKA und
ARTTURI I. VIRTANEN

Laboratorium der Stiftung für chemische
Forschung, Biochemisches Institut,
Helsinki, Finnland

Wie im hiesigen Institut gezeigt werden konnte, ist das Vorkommen von α -Aminoadipinsäure als freie Aminosäure in höheren Pflanzen (z.B. in Erbsenkeimlingen, in Blättern von *Petasites officinalis*, *Fraginus excelsior*, den Samen und Keimlingen von *Vicia faba*, *Lupinus angustifolius*, *Phaseolus vulgaris* etc.) recht häufig.¹ Im Falle von *Pisum sativum* war diese Aminosäure ausschliesslich in jungen Keimpflanzen zu finden^{2,3}. Beweise für das Vorkommen von freier α -Aminoadipinsäure in Pflanzen gründen sich jedoch nur auf papierchromatographische Bestimmungen. Blass und Macheboeuf haben ihren Befund vom Vorkommen von α -Aminoadipinsäure und Hydroxyaminoadipinsäure in *Vibrio cholerae* zurückgezogen⁴. Da freie α -Aminoadipinsäure früher aus Pflanzen nicht isoliert und folglich auch nicht chemisch charakterisiert ist, war es wichtig die chromatographische Befunde jedenfalls in einem Fall durch Isolierung der Säure zu bestätigen. Vorliegende Mitteilung behandelt die Isolierung und Identifizierung von α -Aminoadipinsäure aus jungen Erbsenkeimlingen.

Beschreibung der Versuche und Ergebnisse. Etwa 3,4 kg Samen von *Pisum sativum* wurden über Nacht in Wasser gequollen und dann auf feuchtes Papier ausgesät. Nach drei- bis viertätiger Keimung bei Zimmertemperatur an einer ziemlich dunklen Stelle wurden die Keimlinge dreimal hintereinander mit 80 %igem Alkohol, insgesamt ca. 27 l, extrahiert. Der Extrakt wurde in Vacuum auf etwa 2 l konzentriert und dann durch Kationenaustauscher Amberlite IR-120 laufen gelassen (300 ml Amberlite pro 1 kg Samen). Danach wurde das Harz sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen und die Aminosäuren mit 1 N Ammoniak eluiert, bis sich das Eluat als Ninhydrin-negativ erwies. Das Ammoniak-eluat wurde in Vacuum auf 260 ml eingengt. Die Aminosäuren der ammoniak-

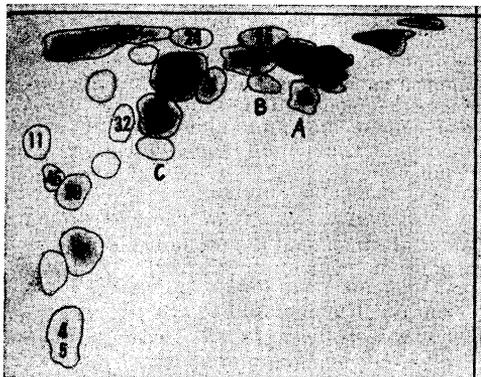


Abb. 1. Chromatogramm der freien Aminosäuren in Keimlingen von *Pisum sativum*. 1 Gly, 2 Ala, 3 Val, 4 Ileu, 5 Leu, 8 Ser, 9 Thr, 11 Pro, 16 Asp, 17 Glu, 24 Glu-NH₂, 25 Asp-NH₂, 29 γ -Aminobuttersäure, 32 β -Alanin, 45 Äthanolamin, 51 Homoserin, A α -Aminoacidipinsäure, B γ -Glutamylalanin, C Tyr.

freien Lösung wurden papierchromatographisch näher untersucht, zweidimensionales Papierchromatogramm, Lösungsmittel: Butanol-Essigsäure-Wasser (630:100:270) und Phenol-Wasser (NH₃) (1 000:365), Papier Whatman No. 4. Das Chromatogramm ist in Abb. 1 zu sehen. Der Fleck A links unterhalb von Glutaminsäure (17) sollte α -Aminoacidipinsäure sein. Die Substanz B ist γ -Glutamyl-Alanin⁸.

Die neutrale Lösung wurde sodann mit Anionenaustauscher IR-4B (1,5 l) behandelt. Die basischen und neutralen Aminosäuren wurden mit Wasser eluiert und die im Harz verbliebenen sauren Aminosäuren danach mit 1 N Salzsäure eluiert. Die Salzsäure wurde in Vacuum verdampft. Man erhielt so eine Aminosäurenfraktion, welche ausser Glutaminsäure und Asparaginsäure auch die zu identifizierende α -Aminoacidipinsäure enthielt. Die zur Trockne eingedampfte Fraktion in wenig Wasser gelöst wurde auf eine (3,2 \times 41,5 cm) Säule Dowex 1 gebracht und mit 0,2 N Essigsäure eluiert (16 ml/min). Unter diesen Bedingungen wurde die als α -Aminoacidipinsäure betrachtete Aminosäure kurz vor Glutaminsäure eluiert. In einigen Fraktionen kam sie zusammen mit Glutaminsäure aus der Säule und wurde dann durch Wiederholung der Fraktionierung als reine Aminosäure gewonnen.

Acta Chem. Scand. 16 (1962) No. 2

Bei der Konzentration in Vacuum der Fraktionen, welche praktisch nur noch die zu bestimmende Substanz enthielten, kristallisierte die Aminosäure sofort aus. Die papierchromatographisch reine Aminosäure wurde aus 1 N HCl-Lösung durch Neutralisieren mit 1 N NaOH als kristalline Substanz umgefällt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Äthanol und Äther wurde das Präparat über Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausbeute 165 mg. Schmp. 195° (Zers.) (unkorr.) (Kofler Mikroheiztisch). $[\alpha]_D^{25} = +23^\circ$ ($c = 2$; in 6 N HCl). (Gef. C 44.16; H 6.99; N 9.20. Ber. für C₆H₁₁O₄N: C 44.71; H 6.88; N 8.69).

Mikro-Stickstoffbestimmung wurde nach Beet⁶ ausgeführt. Das Infrarot-Spektrum der Aminosäure war identisch mit dem der synthetischen L- α -Aminoacidipinsäure.⁷

Windsor⁸, der α -Aminoacidipinsäure in sehr kleinen Mengen als Proteinkomponent aus Maissamen nach Säurehydrolyse gewonnen hat, berichtet, dass α -Aminoacidipinsäure aus einer Dowex 50-Säule mit Salzsäure eluiert, zwischen Glycin und Alanin erscheint. Die von uns isolierte α -Aminoacidipinsäure im Gemisch mit authentischen Alanin, Glycin, Glutaminsäure und Asparaginsäure verhielt sich bei der Elution in einer Dowex 50-Säule mit 1 N Salzsäure wie die Aminosäure von Windsor.

Aus den Resultaten geht hervor, dass α -Aminoacidipinsäure aus 3–4 Tage alten Erbsenkeimlingen isoliert und chemisch identifiziert werden konnte. Das Vorkommen dieser Aminosäure in grünen Pflanzen wurde dadurch bestätigt.

Fräulein K. Aalto sei für die technische Hilfe und Herrn Lic. Techn. Carl Enebäck, Technische Hochschule Helsinki, für die Bestimmung der Infrarot-Spektren bestens gedankt.

1. Berg, A.-M., Kari, S., Alfthan, M. und Virtanen, A. I. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 358.
2. Virtanen, A. I., Berg, A.-M. und Kari, S. *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 1423.
3. Miettinen, J. K., *Ann. Acad. Sci. Fennicae A II*, **1955** No 60, p. 520.
4. Blass, J. und Macheboeuf, M. *Bull. soc. chim. biol.* **29** (1947) 903.
5. Virtanen, A. I. und Berg, A.-M. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 1089.
6. Beet, A. E. *Nature* **175** (1955) 513.
7. Greenstein, J. P. und Winitz, M. *Chemistry of the Amino Acids*, John Wiley, New York 1961 p. 2459.
8. Windsor, E. J. *Biol. Chem.* **192** (1951) 595.

Eingegangen am 2. Januar 1962.