

*Experimental.* The chromatographic methods enable us to detect in plants even small amounts of foreign organic substances, which have been added to the root support. Therefore, we have taken this method into use in this laboratory for studying accumulation of different organic substances in plants and their possible participation in the metabolism. Using the paperchromatographic detection and semiquantitative determination of aliphatic amines described by one of us<sup>4</sup> we have been able to show that dimethylamine, trimethylamine, ethylamine, *n*-propylamine, and *i*-propylamine are taken up by pea plants growing in sterile culture in a nutrient solution containing these amines as their HCl-salts.

A nutrient solution was prepared containing no other source of nitrogen except the amine under study in a quantity representing 25 mg of organic nitrogen per litre of nutrient solution. 6 day old pea plants were grown for three weeks in sterile culture on these nutrients. The plants growing with trimethylamine began to excrete this substance through the leaves after a few days, as could be noticed by their odour.

After three weeks the plants were dried for two days at 40°C and pulverized. Aliquots of 100 mg were thoroughly mixed with 0.50 ml of absolute alcohol containing 2 per cent glacial acetic acid. Series of volumes of 1 to 15  $\mu$ l of the extracts were placed on filter paper (Munktell OB), and chromatographed in the usual manner. These dilution series were compared with known amounts of the amines run on the same chromatogram. As an average of 4 plants, the following amounts of amine were taken up: (On drying some loss of amines occurs).

	Dry weight per plant g	Amine per plant mg	Total N per plant mg
Control	0.213	0.0	5.5
Dimethylamine	0.258	2.9	7.8
Trimethylamine	0.232	1.1	6.2
Ethylamine	0.286	3.1	9.9
Propylamine ( <i>n</i> -)	0.261	1.6	6.7
Propylamine ( <i>iso</i> -)	0.213	1.4	7.3

A photograph of the obtained chromatograms is given in Fig. 1.

A basic compound ( $R_f = 0.20$ ) present in the controls and in plants grown on trimethylamine and propylamines was missing in the plants grown on ethylamine and dimethylamine. The probable metabolic function of

amines in the plant organism is under further investigation in this institute.

One of us (R.S.) wishes to thank the "Stiftung zur Förderung des akademischen Nachwuchses" of the Kanton Zürich, Switzerland, for a grant enabling him to work in this laboratory.

1. Virtanen, A. I. *Ber. N. J. F. Kongres København* (1935) p. 203.
2. Virtanen, A. I., and Linkola, H. *Nature* 178 (1946) 515.
3. Steinberg, R. A. *J. Agr. Research* 75 (1947) 81; *Ibid.* 78 (1949) 733.
4. Schwyzer, R. *Acta Chem. Scand.* In press.

Received September 30, 1951.

## Reduktionsversuche mit Hämoglobin an Benzhydroxamsäure und Brenztraubensäureoxim

R. SCHWYZER

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

Wegen des Auftretens organischer Derivate im lebenden Organismus wurde dem Hydroxylamin die Rolle eines Zwischenproduktes der Stickstoffassimilation zugesprochen.<sup>1</sup> So entstehen aus Hydroxylamin und Derivaten organischer Säuren auf enzymatischem Wege Hydroxamsäuren<sup>2-8</sup>. Es wäre auch denkbar, dass Oxime von Ketosäuren als Zwischenprodukte bei der Verwendung des Hydroxylamins durch den Organismus auftreten, obwohl bisher keine Enzymsysteme aufgefunden worden sind, welche einen solchen Prozess katalysieren<sup>1</sup>.

Ausgehend von Beobachtungen von Colter und Quastel<sup>9</sup> über die Reduktion von Hydroxylamin durch Hämoglobin und Ascorbinsäure, versuchten wir, ob unter ähnlichen Versuchsbedingungen auch Benzhydroxamsäure und Brenztraubensäureoxim zu Benzamid resp. Alanin reduziert werden. Diese Versuche wurden spe-

ziell in Hinsicht auf das Vorkommen von Leghämoglobin in den Knöllchen der Leguminosen ausgeführt.

Mit lysierten Erythrozyten aus Kuhblut werden in Gegenwart von Ascorbinsäure bei pH-Werten von 6,8 und 7,4 im Gegensatz zu Hydroxylamin weder Benzhydroxamsäure noch Brenztraubensäureoxim reduziert.

#### Experimente.

**Hämoglobinlösung.** Frisches, defibriertes Kuhblut wurde zentrifugiert, die Blutzellen wurden 6-mal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen und zuletzt mit ihrem vierfachen Volumen an destilliertem Wasser versetzt. Die klare Lösung wurde bis zu ihrem Gebrauche in gefrorenem Zustande aufbewahrt.

**Reduktion von Hydroxylamin.** Um die Wirksamkeit der Hämoglobinlösung festzustellen, haben wir die Reduktion des Hydroxylamins colorimetrisch verfolgt. Ferrosalze katalysieren, wie wir festgestellt haben, die Reduktion mittels Ascorbinsäure nicht.

3 ml Hämoglobinlösung, 3 ml Ascorbinsäurelösung (frisch hergestellt, 30 mg Ascorbinsäure auf pH = 7,4 abgepuffert) sowie 0,6 ml Hydroxylaminlösung (10 mg HCl-Salz pro ml) wurden vereinigt und bei 38°C aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen und der Hydroxylamingehalt colorimetrisch nach der Vorschrift von Csáky<sup>10</sup> bestimmt (Endverdünnung 1 000-fach). Nach drei Stunden war kein Hydroxylamin mehr nachzuweisen. In dem Kontrollansatz, welcher anstelle des Hämoglobins eine Spur Ferrosalz enthielt, war in dieser Zeit keine Abnahme des Hydroxylamingehaltes nachzuweisen.

**Reduktionsversuch mit Benzhydroxamsäure.** Die Versuche wurden genau gleich angesetzt, nur wurde anstelle des Hydroxylamins Benzhydroxamsäure (9 mg) verwendet. Der Hydroxamsäuregehalt der Lösungen wurde von Zeit zu Zeit colorimetrisch anhand des roten Ferri-Komplexes verfolgt (vgl. Lipmann und Tuttle<sup>11</sup>), nachdem in den Proben Proteine mit Trichloressigsäure entfernt worden waren. Es wurde Sorge getragen, genügend Ferrisalz zuzufügen, um alle Ascorbinsäure zu oxydieren. Auch nach 15 St. (38°C) konnte weder beim pH 7,4 noch 6,8 eine Abnahme des Hydroxamsäuregehaltes festgestellt werden.

**Reduktionsversuch mit Brenztraubensäureoxim.** In gleicher Weise wurde versucht, 10 mg Brenztraubensäureoxim (in Lösung aus äquivalenten Mengen Na-Pyruvat und NH<sub>2</sub>OH·HCl hergestellt) bei pH 6,8 und 7,4 zu reduzieren. Nach 20 St. bei 38°C wurde dem Ansatz soviel abs. Alkohol zugesetzt, bis der Alkohol 75 %ig war. Nach Aufkochen, Filtrieren und Verjagen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen und verschiedene Mengen davon der Papierchromatographie unterworfen (eindimensional, Phenol als Entwicklungsflüssigkeit). Weder in dieser Lösung, noch in einer Kontrolle, welche gleich, aber ohne Brenztraubensäureoxim, hergestellt worden war, liess sich Alanin nachweisen. Dagegen gelang der Nachweis leicht in einem Kontrollansatz, dem zu Beginn Alanin zugesetzt worden war.

Herrn Prof. A. I. Virtanen möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die gastfreundliche Aufnahme an seinem Institute, sowie der »Stiftung zur Förderung des akademischen Nachwuchses« des Kantons Zürich, Schweiz, für ein Reisestipendium bestens danken.

1. Virtanen, A. I. *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A, II. Chem.* No. 39 (1950).
2. Speck, J. F. *J. Biol. Chem.* **168** (1947) 403.
3. Elliot, W. H. *Nature* **161** (1948) 128.
4. Stumpf, P. K., and Loomis, W. D. *Arch. Biochem.* **25** (1950) 451.
5. Waelsch, H., Borek, E., and Grossowicz, N. *Abstr. Am. Chem. Soc., 116th Meet.*, 54 C (1949).
6. Waelsch, H., Owades, Ph., Borek, E., Grossowicz, N., and Schou, M. *Arch. Biochem.* **27** (1950) 237.
7. Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E., and Waelsch, H. *J. Biol. Chem.* **187** (1950) 111.
8. Virtanen, A. I., and Berg, A.-M. *Acta Chem. Scand.* **5** (1951) 909.
9. Colter, J. S., and Quastel, J. H. *Arch. Biochem.* **27** (1950) 368.
10. Csáky, T. Z. *Acta Chem. Scand.* **2** (1948) 450.
11. Lipmann, F., and Tuttle, L. C. *J. Biol. Chem.* **159** (1945) 21.

Eingegangen 15. September 1951.