

Untersuchungen über den Anthocyanstoffwechsel auf Grund der chemischen Eigenschaften der Anthocyangruppe.

Von

Kurt Noack.

Einleitung.

Die Untersuchungen Willstätter's und seiner Mitarbeiter¹ über die Chemie der Anthocyane haben eine sichere Grundlage für die physiologische Forschung geschaffen. Vorliegende Untersuchung befaßt sich in enger Anlehnung an die Befunde Willstätter's mit den chemischen Prozessen, die beim Sichtbarwerden der Anthocyanfärbung das Endglied, beim Verschwinden der Färbung das Anfangsglied des in seinem Gesamtverlauf noch nicht bekannten Farbstoffaufbaus und -abbaus bilden, ohne daß die bei den hier untersuchten Pflanzen gefundenen Prinzipien als die einzigen in der Natur verwirklichten angesehen werden sollen. Außerdem soll noch über einige andere, mit dem Vorkommen des Anthocyans in Zusammenhang stehende Erscheinungen berichtet werden.

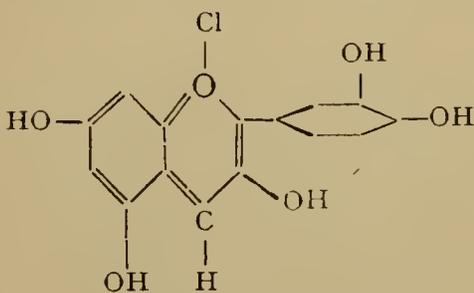
So zahlreich die über die Bildung des Anthocyans vorhandenen Untersuchungen und Anschauungen sind, so entbehren sie doch alle, soweit sie vor den Willstätterschen Untersuchungen entstanden sind, einer tatsächlichen Grundlage. Die nach Willstätter erschienenen Arbeiten haben, insofern sie

¹) Willstätter und Mitarbeiter. Liebigs Annalen. **401**, 1913. S. 189. Sitzsber. pr. Ak. d. Wiss. Berlin. 1914. S. 402, 769, 886. Liebigs Annalen. **408**, 1915. S. 1. Ebenda. **412**, 1916. S. 113.

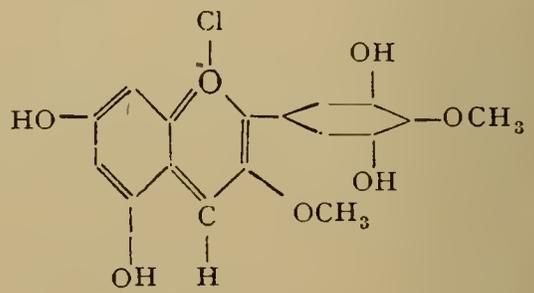
überhaupt diese neu erschlossenen Kenntnisse berücksichtigen, keine Aufklärung in Fragen des Anthocyanstoffwechsels gebracht.

Vorerst mögen die Befunde Willstätter's in großen Zügen mitgeteilt werden.

Die zahlreichen von W. untersuchten Anthocyane sind im Prinzip von gleicher Konstitution und stellen Mono- oder Diglukoside von Abkömmlingen des β -Phenyl-Benzo- γ -Pyriliums dar, die sich voneinander durch Zahl und Stellung angelagerter Hydroxyl- und Methylgruppen unterscheiden. Für das Glukosid wählte W. den Namen »Anthocyanin«, für die zuckerfreie Farbstoffkomponente »Anthocyanidin« als Gattungsbezeichnung. Als Beispiel mögen die Konstitutionsformeln des Anthocyanidins der Kornblume, Cyanidin, und der Weintraube, Oenidin, in Form ihrer Chloride mitgeteilt werden:



Cyanidinchlorid.



Oenidinchlorid.

Die Anthocyane enthalten Glukose, Galaktose und Rhamnose, wobei zwei verschiedene Zuckerarten in einem Molekül vereinigt sein können und wohl auch der noch nicht näher untersuchte Ort der Zuckerbindung bei den einzelnen Anthocyaninen variieren kann. Ein und dasselbe Anthocyanin kann in verschiedenen Pflanzen vorkommen, wie auch eine Pflanze verschiedene Anthocyane enthalten kann.

Die zuckerfreie Farbstoffkomponente kommt nach W. in der lebenden Pflanze sehr selten vor; er fand sie nur in einigen Traubensorten als in saurer Lösung roten Farbstoff.

Die bekannte Abhängigkeit der Farbe der Anthocyane von der Reaktion des Lösungsmittels wird von W. auf folgende Ursache zurückgeführt. Die Anthocyane und Anthocyanidine sind in Verbindung mit Pflanzen- oder Mineralsäuren (vgl. obige

Formeln) im allgemeinen rot; in neutraler Lösung bildet der Farbstoff ein inneres Salz von violetter Farbe; in alkalischer Lösung, die meist blau ist, liegt ein Alkalisalz des Farbstoffs in Form seines inneren Oxoniumsalzes vor.

Für die vorliegende Untersuchung im besonderen wesentlich sind folgende Eigenschaften der Anthocyane:

1. Die Anthocyanine werden durch Erhitzen in verdünnter Mineralsäure leicht in Anthocyanidin und Zucker gespalten. Nun sind die diglukosidischen Anthocyane, soweit sie nicht Rhamnose enthalten, in Amylalkohol sehr schwer, die zuckerfreien Farbstoffkomponenten darin sehr leicht löslich, so daß eine saure Anthocyaninlösung vor der Hydrolyse beim Schütteln mit Amylalkohol an diesen keinen Farbstoff abgibt, während sich aus der hydrolysierten Lösung das abgespaltene Anthocyanidin mit Amylalkohol quantitativ ausschütteln läßt. Bei den Monoglukosiden und den Rhamnose enthaltenden Diglukosiden läßt sich die Trennung der beiden Stufen nicht auf diese Weise ohne weiteres bewerkstelligen, da sich ihre glukosidische Form zwischen Säure und Amylalkohol verteilt.

Diese Reaktion gelingt nicht nur mit den chemisch reinen Diglukosiden, sondern ist auch mit sauren Filtraten von Pflanzenextrakten ausführbar. W. hat bei einer größeren Zahl von Pflanzen die Verteilung des Farbstoffs zwischen Amylalkohol und verdünnter Säure dadurch bestimmt, daß er $\frac{1}{2}$ bis 2 g des frischen Pflanzenmaterials mit einigen ccm verd. Schwefelsäure unter Zusatz von Seesand verrieb, auf der Nutsche absaugte und das Filtrat mit Amylalkohol ausschüttelte. In die Amylalkoholschicht geht häufig etwas Anthocyanin mit über, das sich jedoch durch Waschen mit Wasser, verd. Säure oder Na-Acetatlösung vollständig entfernen läßt, während das nach Hydrolyse des Filtrats in Amylalkohol übergehende Anthocyanidin durch diese Waschmittel nicht zum geringsten Teil ausgezogen werden kann.

Beim Schütteln mit verdünnter Sodalösung geht das Anthocyanidin gemäß seinem sauren Charakter quantitativ in diese über. Jedoch stellt sich hierbei, soweit Pflanzenextrakte verwendet werden, meist nicht der für das jeweilige Anthocyanidin typische Farbumschlag ein, da im Amylalkohol flavonartige

Begleitstoffe mit enthalten sein können, die in Sodalösung mit intensiv gelber Färbung übergehen, so daß eine Mischfärbung resultiert.

2. Anthocyane und Anthocyanidine isomerisieren sich in wäßriger oder alkoholischer Lösung zu farblosen bzw. schwach gefärbten Verbindungen, aus denen auf Säurezusatz der Farbstoff quantitativ zurückgebildet wird. Hierbei gilt nun die Regel, daß sich die Anthocyane (auch die monoglucosidischen) schon in der Kälte sehr rasch isomerisieren und ebenso rasch wieder zum Farbstoff regenerieren lassen, während sich die Anthocyanidine erst beim Erhitzen mit Säure rasch isomerisieren und auch die Umkehrung des Prozesses analogen Charakter aufweist.

3. Die Anthocyane werden von Oxydations- und Reduktionsmitteln leicht angegriffen. Reduktion ergibt farblose, Oxydation gelbe, noch nicht näher untersuchte Verbindungen.

4. Die Anthocyane stehen in naher Beziehung zu den in den Pflanzen weitverbreiteten Flavonen. Es ist W. gelungen, Quercetin zu Cyanidin zu reduzieren, eine Reaktion, die nebenbei bemerkt die Synthese des Cyanidins bedeutet.

Zur Untersuchung unter den eingangs erwähnten Gesichtspunkten erschienen solche Pflanzen besonders geeignet, deren vegetative Organe im Frühjahr mit größeren Anthocyanmengen in Erscheinung treten und den Farbstoff nach kurzer Zeit verlieren.

I. Untersuchungen an *Polygonum compactum* Hook.

A. Voruntersuchung.

Die Laubspresse dieser Pflanze entstehen von Ende April bis Ende Mai aus ihren an unterirdischen Ausläufern sitzenden Anlagen und besitzen während der ersten Tage nach dem Emporkommen über den Boden intensiv rot gefärbte Blätter. In den nächsten Tagen blaßt die rote Farbe ab, um schließlich in reines Chlorophyllgrün überzugehen. (Die jungen Blätter an den Vegetationspunkten älterer Sprosse haben nur wenig Anthocyan.) Während der Farbänderung wachsen die Blätter nur wenig, so daß das Verschwinden der roten Färbung nicht

auf einer Verteilung unveränderten Anthocyans auf eine größere Oberfläche beruht.

Werden einige rote Blätter nach der oben angegebenen Methode auf Anthocyanin untersucht, so ergibt sich, daß der filtrierte saure Extrakt an Amylalkohol nur Spuren von rotem Farbstoff abgibt, die sich durch Waschen mit Wasser oder verdünnter Säure sofort daraus entfernen lassen. Wird die vom Amylalkohol abgetrennte wäßrige Schicht mit stärkerer Schwefelsäure und einigen Tropfen verdünnter Salzsäure versetzt und ca. 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, so läßt sich der rote Farbstoff mit Amylalkohol quantitativ ausschütteln. Der Zusatz von Salzsäure erwies sich als notwendig, da die schön rote Lösung beim Erhitzen ohne HCl-Zusatz sich nach gelbstichig-hellrot oder rötlichgelb verfärbt, während bei Gegenwart von HCl der ursprüngliche Farbton erhalten bleibt. Zwar ist der Teilungskoeffizient der Anthocyane zwischen Salzsäure und Amylalkohol nach Willstätter nicht unendlich, jedoch so groß, daß er bei den hier in Betracht kommenden, relativ geringen Farbstoffkonzentrationen nicht ins Gewicht fällt.

Die Polygonum-Blätter enthalten also Anthocyanin als Diglukosid mit scharfen Verteilungsverhältnissen gegenüber Amylalkohol und verdünnter Säure. Welches von den verschiedenen Anthocyaninen hier vorliegt, ist Aufgabe rein chemischer Untersuchung und hat für den vorliegenden Zweck keine wesentliche Bedeutung.

Das Verhalten der verschiedenen Lösungen gegen Soda ist folgendes: der nicht erhitzte saure Extrakt wird bei vorsichtigem Versetzen mit verdünnter Sodalösung blauviolett; schon bei ganz geringem Überschuß an Soda schlägt die Farbe über gelbbraun nach braun um. Wird die nach Hydrolyse erhaltene amylnkoholische rote Lösung mit Sodalösung vorsichtig versetzt und ausgeschüttelt, so nimmt die wäßrige Schicht intensiv gelbgrüne Färbung an, während der Amylalkohol farblos wird; Säurezusatz liefert wieder rote, amylnkoholische Lösung. Es sind also auch bei Polygonum Begleitstoffe vorhanden, die sich mit Sodalösung intensiv färben.

Die mikroskopische Untersuchung der Blätter weist darauf hin, daß sich diese »Begleitstoffe« zum mindesten teilweise in

räumlicher Trennung vom Anthocyan befinden. Das Anthocyan ist fast ausschließlich in der Epidermis enthalten, nur einige subepidermale Palissadenzellen zeigen blaßrote Färbung. Werden Blattquerschnitte mit 3proz. Sodalösung behandelt, so sind die Epidermiszellen nach einiger Zeit violett, ein kleiner Teil von ihnen schmutzig grün gefärbt, während sich das Mesophyll ziemlich stark gelb oder gelbgrün verfärbt.

Infolge der Anwesenheit dieser flavonartigen Stoffe hat auch die von Willstätter zur Charakterisierung der verschiedenen rein dargestellten Anthocyane benutzte Farbreaktion mit FeCl_3 in alkoholischer Lösung keine ausschlaggebende Bedeutung. Da zur Anstellung dieser Reaktion die Farbstofflösung neutral sein muß und im vorliegenden Falle amylnalkoholische Lösungen vorlagen, wurde das Verfahren, wie aus folgendem hervorgeht, modifiziert. Wird die anthocyanidinhaltige, amylnalkoholische Schicht mit Na-Acetat und dann noch mit Wasser ausgewaschen, hierauf mit Alkohol im Überschuß und einem Tropfen sehr verdünnter FeCl_3 -Lösung versetzt, so entsteht eine tief blaugrüne Färbung. Farbloser, vor dem Erhitzen des sauren Extraktes hergestellter amylnalkoholischer Auszug gibt, ebenso behandelt mit FeCl_3 , intensive, rein grüne Färbung. Es spricht also auch diese Reaktion für die Anwesenheit von flavonartigen Substanzen neben dem Anthocyan.

Auch in mikroskopischen Schnitten läßt sich mit FeCl_3 keine eindeutige Reaktion erzielen, da die anthocyanhaltigen Zellen sich mit FeCl_3 teils grün, teils schwarzviolett färben. Dies könnte von der experimentell nicht beeinflussbaren verschiedenen Reaktion der einzelnen Zellinhalte herrühren, da die zumeist in Violett-färbung sich äußernde Reaktion der reinen Farbstoffe mit FeCl_3 wie erwähnt nur in neutraler Lösung vor sich geht.

B. Das Vorkommen von isomerisiertem Anthocyanidin in den lebenden Blättern.

Wie eingangs erwähnt, fand Willstätter Anthocyanidin als Bestandteil der lebenden Pflanzen nur in einigen Traubensorten und zwar als Farbstoff. Da es nun Willstätter bei seinen im wesentlichen auf die Reindarstellung der Anthocyane

gerichteten Untersuchungen darauf ankam, mit anthocyanreichen Organen, d. h. mit fertig ausgebildeten Blüten und Früchten zu arbeiten, und der Farbstoff dieser Organe wohl in erster Linie um seiner Farbe wegen gebildet wird, lag es nahe, die Blätter von *Polygonum*, deren Farbstoff in augenscheinlicher Weise eng mit dem allgemeinen Stoffwechselgetriebe verbunden ist, auf das Vorhandensein der zuckerfreien Farbstoffkomponente zu untersuchen,

Der filtrierte saure Extrakt von roten Blättern, die Ende April 4 Stunden nach Sonnenaufgang gepflückt worden waren, wurde unerhitzt mit Amylalkohol ausgeschüttelt. Der Amylalkohol war nach Waschen leicht gelb gefärbt und gab bei mehreren weiteren Waschungen keinen Farbstoff an die Waschflüssigkeit ab. Wurde die so vorbehandelte, salzsäurefreie amylnkoholische Lösung mit 5 proz. Schwefelsäure versetzt und im Wasserbad bei 100° erhitzt, so trat auch nach viertelstündigem Erhitzen außer einer Vertiefung des gelben Farbtones keine Veränderung auf. Wurden dagegen vor dem Erhitzen der Schwefelsäure 0,3 ccm einer ca. 17% HCl enthaltenden Salzsäure hinzugefügt, so trat beim Erhitzen nach ca. 5 Minuten blaßrote Färbung in der Amylalkoholschicht auf, die sich bei weiterem Erhitzen in 15 Minuten zu schön roter Farbe verstärkte; wurden 0,6 ccm derselben Salzsäure hinzugefügt, so war die Amylalkoholschicht schon in 5 Minuten schön rot gefärbt und blieb wochenlang unverändert. Beim Schütteln mit der unterschichteten Säure wurde an diese keine Spur des Farbstoffs abgegeben. Die ohne HCl erhitzte amylnkoholische Lösung wurde bei nachträglichem Zusatz von HCl und darauffolgendem Erhitzen nicht mehr gerötet. Eine zweite Ausschüttelung des ursprünglichen Extrakts gab mit HCl erhitzt nur noch Spuren des Farbstoffs, die dritte Ausschüttelung blieb fast farblos.

An Sodalösung gab die rote amylnkoholische Lösung ihre sämtlichen Farbstoffe mit intensiver Gelbgrünfärbung ab; nach rasch darauffolgendem Ansäuern wurde die wässrige Schicht rot und gab den Farbstoff quantitativ wieder an den Amylalkohol ab. Daß diese Gelbgrünfärbung mit Soda eine Mischreaktion darstellt, (vgl. S. 563) geht auch daraus hervor, daß die dritte Amylnkoholausschüttelung an Soda noch intensiv gelb gefärbten

Farbstoff abgab, obwohl der Gehalt des Amylalkohols an rotem Farbstoff gleich Null war. Mit CaCO_3 versetzt wurde die rote amyalkoholische Lösung zuerst violett, dann farblos, auf Säurezusatz und Erhitzen rasch wieder rot. Mit FeCl_3 versetzt, gab die neutralisierte, mit Alkohol im Überschuß versetzte amyalkoholische Lösung eine über schmutziggiolett nach dunkelgrün gehende Färbung, die also ebenfalls eine Mischreaktion darstellt.

Zwischen dieser als Anthocyanidin anzusprechenden Substanz und dem von Willstätter untersuchten Anthocyanidin besteht vielleicht insofern ein Unterschied, als im vorliegenden Fall zur Herstellung des Farbstoffs aus der Pseudobase Salzsäure erforderlich ist. Ob Willstätter auf derartige Verschiedenheiten im Verhalten der Anthocyanidinpseudobasen gegen Salzsäure und Schwefelsäure gestoßen ist, ist nicht ersichtlich, da sich seine Angaben meist nur auf das Verhalten dieser Stoffe gegen Salzsäure beziehen. Es ist daher zu betonen, daß sich das Polygonum-Anthocyanidin, das aus dem Anthocyanin der Blätter durch Säurehydrolyse gewonnen wurde, gegen Schwefelsäure ebenfalls anders als gegen Salzsäure verhält. Ein nur Schwefelsäure enthaltender roter Extrakt aus (roten) Blättern verliert bei Erhitzen seine rote Farbe und wird, wie schon erwähnt, hellrot oder orange, während bei Salzsäure-Gegenwart der ursprüngliche Farbton erhalten bleibt. Vielleicht läßt sich diese Verschiedenheit im Verhalten gegen Mineralsäuren mit Erscheinungen, die aus der Flavonreihe bekannt sind, vergleichen: die Methyläther des Quercetins (z. B. Rhamnetin) vereinigen sich wohl mit Schwefelsäure, nicht jedoch mit Halogenwasserstoffsäuren.

Zu bemerken ist noch, daß in eigenen Versuchen an reinem Cyanidinchlorid festgestellt wurde, daß in Analogie zu dem Chromogen von Polygonum die Pseudobase chemisch bekannten Anthocyanidins gegenüber Amylalkohol und verdünnter Säure dieselben Verteilungsverhältnisse aufweist wie der Farbstoff.

Im ganzen ergibt sich aus den Versuchen folgendes: der aus dem Blätterextrakt in Amylalkohol überführbare Stoff verhält sich wie ein zur farblosen Pseudobase isomerisiertes Anthocyanidin.

Was die Menge dieses Anthocyanidins im Vergleich zu dem im Extrakt vorhandenen Anthocyanin betrifft, so stand

sie bei den hier untersuchten stark rot gefärbten Blättern um ein Mehrfaches hinter dem Anthocyaningehalt zurück.

Das Vorkommen des isomerisierten Anthocyanidins ist nicht auf die jungen roten Blätter beschränkt; Extrakte aus älteren Blättern, sowie aus fertig entwickelten, rein grünen Blättern gaben an Amylalkohol ebenso die Pseudobase des Farbstoffs ab. Bei beiden, roten wie grünen Blättern ist jedoch der Gehalt an Anthocyanidin Schwankungen unterworfen, deren Ursache im nächsten Abschnitt untersucht werden wird.

Merkwürdig ist die Tatsache, daß sich in den Polygonumblättern Anthocyanidin nie in Form seines roten Farbstoffsalzes findet und andererseits das Anthocyanin nicht oder jedenfalls nicht in merklichem Maße in Form seines farblosen Isomeren in der Pflanze vorhanden ist. Extrakte aus jungen und alten Blättern gaben nie vor der Erhitzung einen amylnalkoholischen Auszug, der auch nur im geringsten rot gefärbt gewesen wäre; ferner zeigten Blätter, im Stadium der Entrötung in Säure gelegt, in der Kälte kein Auftreten von rotem Farbstoff an grünen Stellen, wie es bei einer Umwandlung der Anthocyaninpseudobase zum Farbstoff der Fall sein müßte¹; ebenso waren auch die sauren Extrakte rein grüner Blätter immer ungefärbt in der Kälte.

Diese Erscheinung könnte darauf beruhen, daß das Anthocyanin sich in den Vakuolen der protoplasmaarmen Epidermiszellen befindet und dort, wie seine Rotfärbung anzeigt, in einer, die Isomerisation hindernden sauren Lösung enthalten ist, während andererseits das Anthocyanidin sich in den plasmareichen Mesophyllzellen und daher in einem im Großen und Ganzen schwach alkalisch reagierenden Medium befindet, das die Existenz der farblosen Pseudobase begünstigt.

C. Die Abhängigkeit des Anthocyanidgehalts der Blätter von äußeren Faktoren.

Durch zahlreiche Untersuchungen (u. a. Overton², Katić³, v. Porthheim⁴) ist festgestellt, daß die Anthocyanbildung sehr

¹) vgl. die Ausführungen S. 564.

²) Overton, *Jahrb. f. wiss. Bot.* **33**, 1899. pag. 171.

³) Katić, *Beitrag z. Kenntnis d. Bildung d. roten Farbstoffs usw.* Diss. Halle 1905.

⁴) v. Porthheim, *Anz. k. Akad. d. Wiss. Wien.* **15**, 1914. pag. 327.

häufig von drei Faktoren beeinflußt werden kann, von Licht, Wärme, Zuckergehalt der Gewebe, und zwar derart, daß sich diese Faktoren in ihrer Gesamtwirkung summieren oder gegenseitig hemmen können. Belichtung, Abkühlung, Zuckerezufuhr können jedes für sich Anthocyanbildung hervorrufen oder steigern, während gleichzeitige Einwirkung von Licht und Wärme z. B. keinen Effekt hat.

Im folgenden wird gezeigt, daß auch die zuckerfreien Farbstoffkomponenten in Form der Pseudobase derartigen Einflüssen ausgesetzt sein können, speziell daß der Gehalt der *Polygonum compactum*-Blätter an Anthocyanidin im Mai und Juni in weitgehendem Maße vom Licht abhängig ist, ohne daß jedoch die Temperatur eine direkte Gegenwirkung ausüben würde.

Die Versuche wurden unter quantitativ gleichen Verhältnissen ausgeführt. Zur Untersuchung kamen je 8 g frische Blätter, die in 15 ccm 5proz. Schwefelsäure mit etwas HCl-Zusatz mit Seesand verrieben wurden. Das mittelst Nutsche scharf abgesaugte Filtrat wurde zweimal mit je 5 ccm Amylalkohol ausgeschüttelt; die zweite Ausschüttelung, die nur noch geringe Farbstoffmengen lieferte, wurde jedoch nicht berücksichtigt. Die erste Ausschüttelung wurde nach mehrmaligem Waschen mit angesäuertem Wasser zusammen mit 5proz. Schwefelsäure und einigen Tropfen 17 % HCl enthaltender Salzsäure im Wasserbad von 100° 5–10 Minuten erhitzt.

Die Versuche sind mit jungen roten und ausgewachsenen grünen Blättern im Mai und Juni angestellt worden und fielen bei beiden Entwicklungsstadien gleich aus, so daß im folgenden über den Zustand der Blätter keine Angaben gemacht werden.

I. Einwirkung von Lichtabschluß und Abkühlung.

1. Blätter 1½ Std. nach Sonnenaufgang gepflückt, nicht direkt besonnt, Nachttemperaturminimum an der Erdoberfläche 13,4°:

Amylalkoholische Schicht gelblich, erhitzt: blaßrot.

2. Zweig 1½ Std. nach Sonnenaufgang abgeschnitten und im dunklen Eisschrank 8 Std. bei 7° gehalten:

Amylalkoholische Schicht gelblich, erhitzt: kaum sichtbar blaßrot.

3. Blätter desselben Zweiges nach 4 tägigem Aufenthalt im Dunkeln bei 7°:

Amylalkoholische Schicht gelb, erhitzt: schwach blaßrot.

II. Einwirkung von Lichtabschluß und einer Temperatur von 19—20°.

1. Zweig morgens abgeschnitten im Dunkelschrank 7 Std. bei 19—20° gehalten:

Amylalkoholische Schicht gelblich, erhitzt: intensiv gelb.

2. Zweig abends abgeschnitten, über Nacht im Dunkelschrank bei 19—20° gehalten, untersucht nach 12 Std.:

Amylalkoholische Schicht stark gelb, erhitzt: über intensiv gelbgrün nach Dunkelgelb.

3. Derselbe Versuch.

Amylalkoholische Schicht gelblich, erhitzt: kaum sichtbar blaßrot.

III. Einwirkung von Lichtabschluß und einer Temperatur von 37°.

1. Zweig morgens abgeschnitten 8 Std. im Dunkeln bei 37° gehalten (die Blätter waren nach vorübergehendem Turgorverlust rasch wieder normal):

Amylalkoholische Schicht gelb, erhitzt: dunkel orange gelb.

2. Zweig morgens abgeschnitten, 10 Std. im Dunkeln bei 20° gehalten, hierauf weitere 10 Std. im Dunkeln bei 37° gehalten:

Amylalkoholische Schicht gelb, erhitzt: dunkel orange gelb.

IV. Einwirkung der Insolation im Freien bei einer Lufttemperatur von 15—22° im Schatten.

1. Blätter 4^h nachmittags gepflückt, direkte Insolation ca. 4 Std.: Amylalkoholische Schicht gelb, erhitzt: ziemlich stark rot.

2. Blätter 8^h abends gepflückt, Insolation ebenfalls 4 Std. Amylalkoholische Schicht gelb, erhitzt: ziemlich stark rot.

V. Einwirkung von Insolation und einer Temperatur von 25—30°.

Zweig morgens abgeschnitten, in ein stark besonntes Warmhaus gebracht und 8 Std. der direkten Insolation ausgesetzt:

Amylalkoholische Schicht gelblich, erhitzt: intensiv rot.

VI. Vergleich zwischen der Einwirkung von direktem Sonnenlicht und schwachem diffusen Licht bei derselben Lufttemperatur von ca. 20° .

(Obwohl die Insolation in späten Stunden, von 4^{h} bis 8^{h} abends, vorgenommen wurde, ist natürlich eine Temperaturerhöhung in den besonnten Blättern eingetreten; trotzdem verlief der Versuch wie folgt:)

a) Zweig von 4^{h} — 8^{h} abends besonnt, Lufttemperatur 20° : Amylalkoholische Schicht gelb, erhitzt: schön rot.

b) Zweig dieselbe Zeit im Halbdunkel bei derselben Temperatur:

Amylalkoholische Schicht gelb, erhitzt: blaßrot.

VII. Einwirkung der Insolation und einer Lufttemperatur von $15 - 20^{\circ}$ nach 4 tägigem Aufenthalt im Dunkeln bei 7° (Zweige).

a) Blätter sofort nach Entnahme aus dem Eisschrank untersucht:

Amylalkoholische Schicht stark gelb, erhitzt: über intensiv gelb nach rotstichig gelb.

b) Blätter nach 1 stündiger Insolation und 3 stündiger Einwirkung diffusen Tageslichtes:

Amylalkoholische Schicht gelb (schwächer als a), erhitzt: hellrot.

c) Blätter nach 10 stündiger Einwirkung von Insolation und diffusem Tageslicht (beides ca. je 5 Std).

Amylalkoholische Schicht gelblich, erhitzt: intensiv rot.

Aus diesen Versuchen ergeben sich folgende Beziehungen:

1. Der Faktor Licht übt einen starken Einfluß auf den Anthocyanidingehalt der Blätter aus, während die Temperatur hierbei eine untergeordnete Rolle spielt. Im Licht wird bei hoher und bei niedriger Temperatur eine beträchtliche Menge Anthocyanidin gebildet. Nach Aufenthalt im Dunkeln bei niedriger Temperatur ist ein kleiner Betrag von Anthocyanidin vorhanden, während nach Aufenthalt im Dunkeln bei höherer Temperatur kein Anthocyanidin mehr nachgewiesen werden kann.

2. Das Resultat der Einwirkung der verschiedenen Versuchsbedingungen ist unabhängig von der Tageszeit, in der die Versuche vorgenommen werden; Blätter, die morgens ins Dunkle bei höherer Temperatur gebracht werden, liefern ebenso gelben Farbstoff, wie Blätter, die abends diesen Versuchsbedingungen ausgesetzt werden. Es spielen also periodische Stoffwechsellvorgänge, die durch den Wechsel von Tag und Nacht bedingt wären, keine Rolle bei der Farbstoffbildung.

3. Die Reaktion auf die Einwirkung der Versuchsbedingungen ist schon nach wenigen Stunden nachweisbar. Dies steht im Gegensatz zu der Beeinflussung der Anthocyanbildung durch Temperatur und Licht, die sich im allgemeinen weit langsamer einzustellen pflegt. Auch die jungen roten Blätter von *Polygonum compactum* sind nach 4tägigem Aufenthalt im Dunkeln erst wenig entfärbt. Immerhin ist merkwürdig, daß gerade bei einer Polygonacee, bei *Fagopyrum esculentum* von Batalin¹ festgestellt wurde, daß an Keimlingen schon nach 10stündiger Beleuchtung Rotfärbung wahrzunehmen ist und daß schon 4stündige Beleuchtung genügt, um nachher im Dunkeln Rötung hervorzurufen, ein Vorgang, dem L. Linsbauer² den Charakter eines typischen Reizprozesses zuspricht.

Es erhebt sich noch die Frage, in welcher Beziehung der gelbe, sich in seiner Löslichkeit gegenüber Amylalkohol und verdünnter Säure wie Anthocyanidin verhaltende Farbstoff zu den geschilderten Vorgängen steht. Vor allem fällt auf, daß Anthocyanidin und dieser gelbe Farbstoff im allgemeinen vikariierend auftreten. Bei der Oxydierbarkeit der Anthocyane zu gelben Farbstoffen lag es nahe, in dem gelben Farbstoff eine Oxydationsstufe des Anthocyanidins zu vermuten. In der Tat gelingt es, den gelben Farbstoff direkt in der amyalkoholischen Lösung zu einem roten Farbstoff zu reduzieren, der sich in Farbcharakter, Haltbarkeit, Löslichkeit gegenüber den Systemen Amylalkohol — verdünnte Säure, — Wasser, — Na-Acetat, — Sodalösung, gegen CaCO_3 usw. wie der in den Lichtversuchen direkt erhaltene rote Farbstoff verhält.

¹) Batalin, Acti horti Petropolitani 6, 1879. (Ref. Just's bot. Jahresber. 7. 1, 1883).

²) Linsbauer, L., Wiesner-Festschrift 1908. Wien. pag. 421.

Die Reduktion wurde folgendermaßen ausgeführt:

Eine gelbe, nicht erhitzte amyalkoholische Lösung wurde mit 5 ccm Schwefelsäure (5%) und 1 ccm Salzsäure (17% HCl) versetzt, dann wurde eine Messerspitze Zinkstaub zugesetzt, das Reagenzglas in Eiswasser gestellt und ein Stück Magnesiumband so weit eingetaucht, daß die Reaktion nicht zu stürmisch verlief und die Temperatur nicht über 20° stieg. Nach wenigen Minuten wurde die amyalkoholische Lösung farblos oder hellrot und sofort mittelst Filtrierens durch einen kleinen Wattebausch der weiteren Reduktion durch Abscheiden der Metallteilchen entzogen. Nach Entfernen der mit durch das Filter passierten wäßrigen Schicht und nach Auswaschen wurde die amyalkoholische Lösung in Gegenwart von etwas Salzsäure im Wasserbad bei 100° erhitzt, nach ca. 3—5 Minuten war die amyalkoholische Lösung schön rot gefärbt.

Auch hier ist der Zusatz von HCl bei der Isomerisation durch Erwärmen wesentlich, um eine Zersetzung des Farbstoffs zu vermeiden. Wichtig ist vor allem, die Reduktion in der Kälte vorzunehmen und zur richtigen Zeit zu unterbrechen, da das gebildete Anthocyanidin bei zu starker oder zu langer Reduktionswirkung in eine farblose Verbindung übergeht.

Wenn natürlich auch hier erst die Reindarstellung des gewonnenen Farbstoffs eine vollkommene Sicherheit über seine Konstitution geben kann, so ist doch nochmals zu betonen, daß zwischen dem durch Reduktion erhaltenen, dem durch Erhitzen ohne Reduktion und dem aus dem Polygonum-Anthocyanin durch Hydrolyse erhaltenen Farbstoff mit den zugänglichen Mitteln kein Unterschied aufzufinden war.

Vor allem ist der durch Reduktion erhaltene Farbstoff, natürlich in seiner zum Farbsalz isomerisierten Form untersucht, absolut beständig in saurer Lösung, auch bei längerem Erhitzen. Es ist dies wichtig, da mehrere durch Reduktion erhaltene, anthocyanartige Stoffe früher beschrieben worden sind, denen Willstätter die Anthocyanatur auf Grund ihrer Unbeständigkeit abspricht. Außerdem mußte noch ein von Willstätter bei der Reduktion des Quercetins zu Cyanidin erhobener Befund in Erwägung gezogen werden: Diese bei höchstens 0° ausgeführte

Reduktion lieferte einen bläuroten Farbstoff, der sich vom Cyanidin dadurch unterscheidet, daß er schon in $\frac{1}{2}$ %iger Salzsäure in der Kälte sich rasch, in Wasser sofort entfärbt. Willstätter nimmt an, daß bei der Bildung dieses Stoffes, den er »Allocyanidin« nennt, der Pyronring des Quercetins gesprengt wird. Wurde die Reduktion bei 35° vorgenommen, so entstand neben Allocyanidin, das auch hier das Hauptprodukt bildete, Cyanidin.

Da nun die Reduktion der Farbstoffvorstufe bei Polygonum nur in niedriger Temperatur, allerdings nicht erst bei 0° , maximale Ausbeute gab, mußte geprüft werden, ob sich der erhaltene Farbstoff etwa wie Allocyanidin verhielt. Wurde jedoch eine rote amylnalkoholische Lösung mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion ausgewaschen, so war sie nicht im geringsten abgeblaßt und erwies sich über $\frac{1}{2}$ %iger Salzsäure aufbewahrt haltbar. Es lag also für die Anwesenheit vom Allocyanidin oder einem diesem verwandten Stoff kein Anhaltspunkt vor.

Merkwürdig ist dagegen, daß Willstätter sowohl das Cyanidin als auch das Allocyanidin aus Quercetin sofort in Form der Farbsalze erhielt, während die Reduktion der betreffenden Vorstufe des Polygonum-Anthocyanidins zunächst die Pseudobase liefert. Es lag nahe, diese Tatsache aus der Verschiedenheit der von Willstätter und der in vorliegender Arbeit angewandten Reduktionsmethode zu erklären; Willstätter ließ auf Quercetin in salzsauer-alkoholischer Lösung Na-Amalgam oder Magnesium in Gegenwart von Quecksilber einwirken. Es wurde daher eine Reduktion von Quercetin unter denselben Bedingungen vorgenommen, wie sie sich bei der Untersuchung von Pflanzenextrakten nötig erwiesen: eine kleine Menge Quercetin (Merck) wurde in mit 17%iger Salzsäure versetztem Amylnalkohol heiß gelöst; der gelben Lösung wurde nach dem Erkalten weitere Salzsäure, ferner Zink und Magnesium in kleinen Portionen zugesetzt und die Reduktion teils in Zimmertemperatur, teils in Eiswasser vorgenommen; im ersten Fall stieg die Temperatur der Lösung nicht über 60° , im zweiten Fall nicht über 20° . Die Reduktion bei höherer Temperatur ergab nach ca. 5 Minuten eine blaßrote Lösung, die nach Abfiltrieren bei 100° gehalten rasch sich zu schönem Rot verstärkte; quercetinreichere

¹⁾ Willstätter und Mallison. Sitzgsber. pr. Ak. d. Wiss. Berlin 1914. pag. 769.

Lösungen gaben schon bei der Reduktion stärkere Rotfärbung, jedoch nahm auch hier beim nachherigen Erhitzen auf 100° die Farbstoffmenge noch zu. Die bei niedriger Temperatur ausgeführte Reduktion ergab dagegen eine gelbgrüne Lösung, die nach Filtrieren auf 100° erhitzt nur schwach rotstichig wurde.

Der bei höherer Temperatur erhaltene Farbstoff war nicht Allocyanidin, sondern Cyanidin (geprüft wie oben).

Hieraus folgt, daß Quercetin, wenn es bei ca. 60° in salzsauer-amylalkoholischer, verdünnter Lösung mit Zn und Mg reduziert wird, das Cyanidin zum größten Teil als Pseudobase liefert und sich in diesem Punkt genau wie die Oxydationsstufe des Anthocyanidins in den Polygonum-Blattextrakten verhält. Hieraus darf natürlich noch nicht ein Schluß auf die Identität dieser Oxydationsstufe mit Quercetin geschlossen werden.

Wenn die bei dieser Art der Reduktion günstige Temperatur höher ist als bei der von Willstätter angewandten Reduktionsmethode, so mag dies mit einem reduktionshemmenden Einfluß des Amylalkohols als Lösungsmittel zusammenhängen, analog wie Äther, Benzol usw. als Lösungsmittel die oxydierende Wirkung von KMnO_4 abschwächen.

Der Reduktionsversuch mit Quercetin ist noch insofern von Bedeutung, als er die Berechtigung darlegt, die mit den amylalkoholischen Auszügen aus Polygonumextrakten erhaltenen Farbreaktionen als Mischreaktionen zu betrachten, bei denen Flavone beteiligt sind. Die amylalkoholische Lösung enthält nach der Reduktion natürlich noch unangegriffenes Quercetin; die Farbe schlägt beim Auswaschen mit Na-Acetat in tiefes Violettrot um; der Farbstoff geht quantitativ in Sodalösung mit schön grüner Farbe, d. h. einer Mischfarbe aus dem Gelb des Quercetins und dem Blau des Cyanidins in alkalischer Lösung; analog ist das Verhalten der neutralen mit Alkohol versetzten amylalkoholischen Lösung gegen FeCl_3 : ein Tropfen verdünnter FeCl_3 -Lösung gibt olivgrüne Färbung.

Im ganzen darf also wohl mit Sicherheit angenommen werden, daß der rote Farbstoff, der durch künstliche Reduktion aus dem gelben Farbstoff der im Dunkeln gehaltenen Polygonum-Blätter erhalten wird, identisch

ist mit dem roten Farbstoff, der aus belichteten Blättern ohne Reduktion erhalten wurde, d. h. er stellt ein Anthocyanidin dar.

Daher war es von Wert, festzustellen, in welchem quantitativen Verhältnis das durch künstliche Reduktion darstellbare Anthocyanidin zu dem genuin vorhandenen Anthocyanidin bei den einzelnen Versuchen stand. Es ergab sich dabei durchweg, daß umsomehr Anthocyanidin durch Reduktion *in vitro* erhalten werden konnte, je weniger roter Farbstoff sich in derselben Versuchsportion als Pseudobase vorfand und umgekehrt.

Als Beispiel sei der Versuch VII (S. 572) angeführt: Die direkt nach der Entnahme aus dem dunklen Eisschrank untersuchten Blätter hatten so gut wie kein Anthocyanidin, dagegen eine bedeutende Menge seiner Oxydationsstufe, da die amyalkoholische Schicht erst nach der Reduktion beim Erhitzen intensiv rot wurde. Die Blätter, die nach dem Aufenthalt im Eisschrank 4 Stunden belichtet worden waren, hatten ziemlich viel Anthocyanidin, dagegen viel weniger von der Oxydationsstufe als die erste Portion. Die 10 Stunden belichteten Blätter hatten noch mehr Anthocyanidin, dagegen noch weniger von der Oxydationsstufe als die zweite Portion.

Die Beurteilung der durch Reduktion erhaltenen Anthocyanidmenge stößt allerdings unter Umständen auf gewisse Schwierigkeiten, da sich ja in derselben amyalkoholischen Schicht gleichzeitig genuines Anthocyanidin befinden kann. Nun wird, wie schon erwähnt, das Anthocyanidin von naszierendem Wasserstoff zu einer farblosen Stufe reduziert, die nicht ohne weiteres, jedenfalls nicht durch Erhitzen, wieder zum Farbstoff oxydiert wird; jedoch ist zur vollständigen Reduktion des Anthocyanidins zu einer farblosen Verbindung unter den angewandten Versuchsverhältnissen längere Zeit erforderlich als zur Erzielung einer maximalen Ausbeute an Anthocyanidin aus der Oxydationsvorstufe günstig ist. Die Folge ist die, daß unter Umständen die nach Reduktion auf Erhitzen hin erhaltene rote Lösung teils aus genuinem, der Reduktion entgangenem, teils aus künstlich aus der Oxydationsstufe entstandenen Anthocyanidin besteht. In den meisten Fällen bieten jedoch, wie die

Tabelle (s. u.) zeigt, diese Verhältnisse der Beurteilung keine Schwierigkeiten, führen jedoch zur Folgerung, daß in Fällen, wie in Vers. VII.c, bei denen sehr viel genuines Anthocyanidin vorhanden ist, die geringe nach Reduktion erhaltene Farbstoffmenge nicht auf das Vorhandensein einer Oxydationsstufe hinweist, sondern einen unreduziert gebliebenen Rest genuinen Anthocyanidins darstellt; mit anderen Worten: es ist hier wahrscheinlich in den lebenden Blättern eine quantitativ vollständige Reduktion der vorhandenen Oxydationsstufe zur Farbstoffpseudobase vor sich gegangen.

In folgender Tabelle sind die wichtigeren Versuche zusammengefaßt.

No.	Versuchsdauer	Lichtverhältnisse	Temperatur	Farbe des amylalkoh. Auszugs		
				A nicht erhitzt	B ₁ erhitzt	B ₂ reduziert, dann erhitzt
I,2	8 Std.	Du	7°	gelblich	schwach blaßrot	stark rot
II,1	7 Std.	Du	19—20°	gelb	stark gelb	stark rot
II,2	12 Std.	Du	19—20°	stark gelb	dunkelgelb	stark rot
III,1	8 Std.	Du	37°	gelb	orange gelb	stark rot
IV	16 Std.	Sonne + diff. Li.	15—22°	gelb	rot	blaßrot
V	8 Std.	Sonne	25—30°	gelblich	stark rot	blaßrot
VI { ^a _b }	4 Std. {	Sonne halbdunkel	ca. 20° {	gelb gelb	rot blaßrot	hellrot hellrot
VII { ^a _b _c }	4 Tage bei 7° im Du	{ sofort untersucht + 4 Std. Licht + 10 Std. Licht		stark gelb gelb gelblich	orange gelb hellrot stark rot	stark rot hellrot blaßrot

Zusammengefaßt ergibt sich, daß die Einwirkung von Licht und Temperatur auf den Anthocyanidingehalt der Polygonumblätter auf folgende Momente zurückgeführt werden kann:

In den Blättern ist eine größere Menge einer Oxydationsstufe des Anthocyanidins vorhanden, die auf photochemischem Wege und daher in weitgehender Unabhängigkeit von der Temperatur vital zu Anthocyanidin reduziert wird. Das Anthocyanidin wird im Dunkeln wieder zur gelben Oxydationsstufe oxydiert und zwar naturgemäß in Abhängigkeit von der Tem-

peratur (cf. Tabelle u. a. Nr. I, 2 und II 1). Es wird sich daher bei Tage ein je nach Tageszeit, Licht- und Temperaturverhältnissen verschiedener Gleichgewichtszustand zwischen den beiden Stufen einstellen.

Weitere Untersuchungen müßten zeigen, ob hier ein Sauerstoffüberträger nach Art der Atmungschromogenen Palladins vorliegt, mit dem Unterschied, daß hier die reduzierte Stufe einen (zur farblosen Pseudobase isomerisierten) Farbstoff darstellt.

Ferner müssen Versuche mit dem glukosidischen Anthocyanfarbstoff zeigen, ob diese Resultate sich auf die Abhängigkeit der Anthocyaninbildung von Licht und Temperatur übertragen lassen. Es wäre denkbar, daß die konträre Wirkung von Belichtung und Erwärmung bei der Rötung der Pflanzen in der freien Natur sich in ähnlicher Weise in zwei chemische Prozesse auflösen ließe: photochemische, von der Temperatur unabhängige Reduktion eines Chromogens zum Farbstoff und durch Temperaturerhöhung beschleunigte Oxydation des Farbstoffs zu einer gelben Verbindung, wobei natürlich auch das reizphysiologische Moment zu berücksichtigen ist (vgl. S. 573). Ein Zusammenhang mit den hier mitgeteilten Resultaten ist andererseits ohne weiteres gegeben, wenn angenommen wird, daß auch beim Anthocyanin-Entstehen und -Vergehen sich an zuckerfreiem Chromogen, bzw. Farbstoff, die Reduktions- und Oxydationsprozesse abspielen, derart, daß die Bindung an Zucker erst nach stattgefunder Reduktion, die Oxydation unmittelbar nach Zuckerabspaltung erfolgt. Diese Hypothese soll zu gelegenerer Zeit unter Zuhilfenahme quantitativer Zuckeranalysen geprüft werden, zumal sich hierfür in Versuchen an abgetöteten Blättern (cf. Abschnitt E) wichtige Anhaltspunkte ergeben.

D. Über das Vorkommen weiterer Chromogene in den Polygonumblättern.

In den roten, wie in den grünen Blättern von *Polygonum compactum* sind außer dem Anthocyanidin-Chromogen im Mai und Juni noch weitere Chromogene vorhanden, deren Abhängigkeit von irgendwelchen Faktoren zwar nicht untersucht wurde,

deren Vorhandensein aber für die Erklärung einiger der im nächsten Abschnitt zu besprechenden Erscheinungen von Belang ist.

Der saure, filtrierte, farblose Extrakt aus den grünen Blättern wurde mehrmals mit Amylalkohol ausgeschüttelt, bis die farblose amylnalkoholische Schicht an Sodalösung keinen gelben Farbstoff mehr abgab; hierauf wurde die wäßrige Schicht durch Filtrieren mit angefeuchtetem Filter von suspendierten Amylnalkoholresten befreit und nach Zusatz von ca. 15 proz. Schwefelsäure und etwas Salzsäure im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach 5, längstens 10 Min. war die Flüssigkeit hellbraun mit Stich ins Rote gefärbt und gab an Amylnalkohol den Farbstoff quantitativ ab.

Der Amylnalkohol nahm eine intensiv braunrote Färbung an, die bei den einzelnen Versuchen mehr oder weniger ins Reinrote spielte. Infolge dieser Variation und weil die amylnalkoholische Lösung an Na-acetatlösung z. Tl. rein braunen Farbstoff abgab, wurde vermutet, daß hier zwei verschiedene Farbstoffe vorliegen, von denen der eine, ein roter, dem Anthocyanidin nahe steht. Braunfärbung ist nun bei Pflanzenextrakten meist das Resultat einer Oxydation, während andererseits das Anthocyanidin sich auch bei Luftabschluß aus der farblosen Pseudobase in den Farbstoff umwandelt, wobei, wie früher erwähnt, bei Polygonum die Gegenwart von HCl Bedingung ist. Unter Berücksichtigung dieser Momente wurde versucht, das Vorhandensein von zwei verschiedenen Farbstoffen nachzuweisen.

Der mit Amylnalkohol ausgewaschene Extrakt wurde in schwefelsaurer Lösung (ohne HCl) mit luftfreiem Paraffinöl in hoher Schicht überschichtet und 10 Minuten bei 100° gehalten: Die Lösung blieb farblos. Damit ist erwiesen, daß die Bräunung beim Erhitzen ein Oxydationsvorgang ist.

Eine zweite Portion desselben Extraktes wurde unter Paraffinöl unter Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure erhitzt. Nach 5 Min. trat eine rein hellrote Färbung auf. Der Farbstoff ging quantitativ in Amylnalkohol und erteilte diesem (infolge der höheren Konzentration in der wenige ccm betragenden Amylnalkoholmenge) ziemlich intensiv rein rote haltbare Fär-

bung. Damit ist erwiesen, daß die Entstehung des roten Farbstoffs keinen Oxydationsprozeß darstellt.

Eine dritte Portion, an der Luft in Schwefelsäure (ohne HCl) erhitzt, gab nach 5 Min. reine Braunfärbung, während eine vierte Portion an der Luft mit Salzsäure erhitzt, sich rotstichigbraun verfärbte; entsprechend war die Färbung der amylnalkoholischen Auszüge der beiden letzten Portionen.

Aus diesen Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen: In den grünen Blättern von *Polygonum* sind außer dem schon beschriebenen Chromogen zwei weitere Chromogene vorhanden, die beide dem Anthocyanin insofern nahe stehen, als sie erst nach Erhitzen in saurer Lösung an Amylnalkohol quantitativ Farbstoff abgeben. Vorbehaltlich einer exakten chemischen Untersuchung wären sie also als Glukoside anzusprechen, die durch heiße Säure hydrolysiert werden können. Das eine Chromogen wird durch Oxydation in einen braunen Farbstoff übergeführt, während das andere durch Isomerisation in eine rote Farbstoffmodifikation umgewandelt wird. Dieser rote Farbstoff weicht von den Anthocyaninen insofern ab, als zu seiner Entstehung aus der Pseudobase Erhitzen erforderlich ist. Es ist nun interessant, daß Willstätter und Nolan¹ bei der Reindarstellung des Rosenanthocyans auf ein glukosidisches Chromogen von ähnlichen Eigenschaften gestoßen sind. Die Verfasser fanden, daß ein methylalkoholisch-salzsaurer Auszug aus getrockneten roten Rosenblüten beim Stehen nach 2 Tagen seine Farbintensität verdoppelt hatte. Sie berichten weiter (l. c. pag. 4 f.): »Die beschriebene Erscheinung beruht nicht auf dem Vorkommen des farblosen Isomeren, der Pseudobase des Cyanins², denn diese wird, wie besondere Versuche gezeigt haben, in chlorwasserstoffhaltiger methylalkoholischer Lösung mit großer Geschwindigkeit in Farbsalz verwandelt. Es handelt sich auch nicht um Oxydation einer Leukoverbindung, die Vertiefung der Farbe erfolgt nicht schneller beim Einleiten von Luft als in Stickstoffatmosphäre. Daher scheint die Annahme nicht unmöglich, daß neben dem Cyanin ein noch unbekanntes Anthocyan vorkomme, dessen farblose isomere Form

¹) Willstätter und Nolan. *Liebigs Annalen*. 408, 1914. p. 1.

²) Um solches handelt es sich beim Rosenanthocyan.

unter diesen Bedingungen langsamer in Farbsalz verwandelt würde“.

Auf ähnliche Weise konnten die beiden Chromogene nun auch in den roten Polygonumblättern nachgewiesen werden. Die etwas verdünnten, anthocyanhaltigen roten Extrakte nahmen beim Erhitzen mit Salzsäure eine oft beträchtlich tiefere Färbung mit Stich ins Braune an; nach Überführung der hydrolysierten Farbstoffe in Amylalkohol gab dieser nach Auswaschen an Na-Acetatlösung eine kleine Menge braunen Farbstoffs ab.

Der Gehalt der Blätter an diesen Stoffen ist ebenfalls Schwankungen unterworfen, ohne daß dieser Erscheinung bis jetzt weiter nachgegangen worden wäre. Es ist nur zu bemerken, daß der Gehalt der Blätter an amyalkoholunlöslichem Chromogen nicht parallel läuft mit dem Gehalt an der als Anthocyanidinpseudobase angesprochenen Substanz; die Extrakte konnten durch 3—4maliges Ausschütteln mit Amylalkohol vollkommen von der Anthocyanidinpseudobase befreit werden, derart, daß die letzte Amylalkoholausschüttelung nur noch Spuren roten Farbstoffs oder gar keinen beim Erhitzen ergab, und wurden beim Erhitzen doch intensiv rot und zwar auch in Fällen, in denen die amyalkoholischen Auszüge im Ganzen nur wenig roten Farbstoff beim Erhitzen lieferten.

Den vorhandenen braunen Farbstoff auf dem Wege der Reduktion in roten überzuführen, ist nicht gelungen.

Wie bemerkt, wurden die bis jetzt in diesem und die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Resultate mit Blättern im Mai und Juni erhalten. Ganz anders waren die Erscheinungen, die sich im Monat August und September desselben Jahres an derselben Pflanze darboten.

Die inzwischen derb lederig gewordenen Blätter lieferten ziemlich stark gelb gefärbte saure Extrakte, die an Amylalkohol ein Chromogen abgaben, das auf Erhitzen in Gegenwart von Salzsäure intensiv violettrot, seltener rot wurde. Zum Unterschied von dem amyalkohollöslichen Chromogen der Frühjahrsblätter, das den Extrakten durch 3—4 Ausschüttelungen vollständig entzogen werden konnte, ließ sich dieses

Chromogen erst durch ca. 10maliges Ausschütteln entfernen, ohne daß jedoch der Chromogengehalt der letzten Ausschüttelungen besonders hoch gewesen wäre, ferner wurde dieses Chromogen durch Erhitzen mit Schwefelsäure nicht zerstört wie das Frühjahrschromogen, sondern lieferte nach Erhitzen mit Schwefelsäure — wobei eine Vertiefung der gelben Farbe der Lösung eintrat — und darauffolgendem Erhitzen mit Salzsäure so viel roten Farbstoff wie ohne vorheriges Erhitzen in Schwefelsäure; außerdem ist dieser rote Farbstoff gegen Reduktion beständiger als der Farbstoff des Frühjahrs.

Der mit Amylalkohol ausgewaschene Extrakt verfärbte sich beim Erhitzen mit Salzsäure regelmäßig nur zu leichtem Hellbraun; das amyalkoholunlösliche Chromogen der Frühjahrsblätter ist also im August nicht mehr vorhanden. Infolge dessen konnte das Verhalten des amyalkohollöslichen Chromogens hier auch in saurer-wäßriger Lösung untersucht werden; der nicht mit Amylalkohol vorbehandelte saure Extrakt färbte sich beim Erhitzen mit Salzsäure intensiv rot, nach ca. 5 Min. trat eine starke Trübung auf, beim Abkühlen schlug sich der Farbstoff fast quantitativ in roten Flocken ab, die in Amylalkohol und Äthylalkohol sich leicht mit dunkelroter Farbe lösten. Die amyalkoholische Lösung wurde beim Schütteln mit Na-Acetatlösung schön violettrot; die äthylalkoholische Lösung wurde auf Sodazusatz blauviolett und mit Säure wieder rot; Eisenchlorid ergab in der neutralen äthylalkoholischen Lösung schwarzviolette Färbung und Fällung.

Vor allem ist bemerkenswert, daß das Auftreten dieses Chromogens in keiner Abhängigkeit von Licht und Temperatur steht. Blätter, die bis zu 2 Tagen bei 37° im Dunkeln gehalten worden waren, hatten so viel Chromogen wie frische, belichtete Blätter.

Aufgabe einer weiteren Untersuchung wäre es, die physiologischen Zusammenhänge zwischen den Chromogenen des Frühjahrs und dem des Sommers aufzuhellen. Über die Ähnlichkeit des Sommerchromogens mit anderen, in der Literatur schon beschriebenen Chromogenen wird im letzten Teil der Arbeit noch zu sprechen sein.

Bis jetzt wurde von Polygonaceen nur *Polygonum compactum* eingehender untersucht. Orientierende Versuche, die mit anderen

Polygonaceen angestellt wurden, zeigten, daß das Vorkommen von Chromogenen, die den beschriebenen analog sind, in der Familie verbreitet ist. Da diese Versuche erst im Sommer angestellt wurden und wie bei *Polygonum compactum* in dieser Zeit keine Beziehung der Chromogene zu äußeren Faktoren festgestellt werden konnte, ist noch nicht entschieden, ob ein von Licht und Temperatur abhängiges Frühjahrschromogen auch bei anderen Polygonaceen auftritt. In größerer Menge wurde z. B. bei *Fagopyrum tartaricum* Gaertn. amyalkohollösliches Chromogen nachgewiesen, in geringerer bei *Polygonum virginianum* L. und *Rumex confertus* L.; kein Chromogen fand sich bei *Rumex scutatus* L.

Auch die Oxydationsstufe des Farbstoffs konnte in manchen Fällen nachgewiesen werden, so bei *Polygonum virginianum* L. und *Rumex scutatus* L.

Zu untersuchen ist noch, ob diese Oxydationsstufe Beziehungen zu den bisher in Polygonaceen nachgewiesenen Flavonderivaten zum Rutin und der zugehörigen zuckerfreien Substanz dem Quercetin besitzt bzw. vielleicht mit Quercetin identisch ist.

E. Fermentative Hydrolyse des Polygonumanthocyanins.

Welche chemischen Prozesse spielen sich im Frühjahr beim Verschwinden des Anthocyans in den Blättern ab? Eine Isomerisation zur farblosen Pseudobase allein kommt, wie S. 569 gezeigt wurde, nicht in Betracht; eine Auswanderung unveränderten Anthocyanins aus den Blättern ist nicht wahrscheinlich. Dagegen liegt bei der Glukosidnatur des Anthocyanins die Annahme einer Spaltung in Anthocyanidin und Zucker nahe.

Da im Abschnitt C gezeigt wurde, daß sowohl rote als grüne Blätter einen je nach den äußeren Bedingungen schwankenden Gehalt an Anthocyanidin aufweisen, war es nicht möglich, durch Untersuchung an lebenden Blättern die Menge des vorhandenen Anthocyanidins in Beziehung mit der Abnahme des Anthocyaningehalts zu bringen, wenn auch hervorgehoben sei, daß der Gehalt an Anthocyanidin bei sich entrötenden Blättern *ceteris paribus* stärker zu sein scheint als bei den übrigen Blättern. Es wurde daher versucht, bei postmortalen Vorgängen eine Hydrolyse des Anthocyanins zu fassen.

Dies gelang mittelst Autolyse in sauerstoffreicher Atmosphäre.

Die Versuche wurden unter gleichen quantitativen Verhältnissen vorgenommen. Die Blätter wurden mit etwas Seesand und so viel Leitungswasser zerrieben, daß ein eben noch flüssiger Brei entstand; diesem wurde eine kleine Menge CaCO_3 zur Verhütung einer Ansäuerung, und Thymol oder Toluol als Antiseptikum zugesetzt. Der Brei wurde dann in Portionen von 9 ccm in enge Röhren abgefüllt und diese verschieden lange Zeit in gut schließenden Exsikkatoren über Pyrogallat bei Zimmertemperatur gehalten. Nach der Entnahme aus dem Exsikkator wurden die einzelnen Portionen sofort mit 5%iger Schwefelsäure und etwas Salzsäure in gleichen Mengen versetzt, scharf abgesaugt und das Filtrat mit 5 ccm Amylalkohol ausgeschüttelt. Die amyalkoholische Schicht wurde vor der weiteren Untersuchung mit angesäuertem Wasser ausgewaschen.

Es sei nochmals daran erinnert, daß sich die Anthocyanine in verdünnter neutraler Lösung rasch schon in der Kälte zur farblosen Pseudobase umlagern und auf Säurezusatz auch in der Kälte ebenso rasch wieder rot werden, während bei den Anthocyanidinen beide Prozesse langsamer verlaufen.

I. Autolyse roter Blätter-Reibgemische, Versuchsdauer 2 Tage.

1. Hauptversuch: Die vor Beginn des Versuchs rote Färbung ist verschwunden und hat der chlorophyllgrünen Färbung Platz gemacht. Auf Säurezusatz wurde das Autolysat sofort blaßrot. Filtrat mit Amylalkohol ausgeschüttelt: Der Farbstoff geht zum größten Teil in den Amylalkohol und läßt sich nicht mehr daraus mit angesäuertem Wasser entfernen; die Farbe vertieft sich zu dunkelrot beim Erhitzen des Amylalkohols über HCl . Die Farbe der zweimal mit Amylalkohol behandelten wäßrigen Schicht ist nur schwach blaßrot. Die Reaktion der amyalkoholischen Lösung gegen Sodalösung, CaCO_3 , und (nach Neutralisation) gegen FeCl_3 ist dieselbe, die früher für das künstlich abgespaltene Anthocyanidin angegeben wurde.

2. Kontrollversuch: Das Reibgemisch wurde vor Einbringen in den Exsikkator 3 Minuten in siedendes Wasser gestellt.

Farbe des Autolysats ebenfalls grün, jedoch auf Ansäuern sofort stark rot. Filtrat mit Amylalkohol ausgeschüttelt: amyalkoholische Schicht gelblich, erhitzt über Salzsäure: keine Spur von Rötung, nur Vertiefung des gelben Farbtons. Die wäßrige, zweimal mit Amylalkohol ausgewaschene Schicht ist so stark rot wie eine vor Beginn der Versuche angesetzte Kontrollportion des frischen Reibgemisches.

Das im Versuch 2 vorhandene ungespaltene Anthocyanin wurde in der Siedehitze mit Säure hydrolysiert und das quantitativ abgespaltene Anthocyanidin in 5 ccm Amylalkohol aufgenommen. Der kolorimetrische Vergleich dieser Anthocyanidinmenge mit der in Versuch 1 auf autolytischem Wege erhaltenen ergab auch bei Verdünnung der Lösungen mit frischem Amylalkohol ziemliche Übereinstimmung. Die amyalkoholische Lösung des künstlichen Hydrolysats war etwas stärker gefärbt; dies rührt offenbar von der Anwesenheit der im vorigen Abschnitt beschriebenen Chromogene her, die sich beim Erhitzen der wäßrigen Lösung zum Teil in ihre Farbstoffstufe umgewandelt haben. Daß jedoch nicht diese Chromogene es sind, die in dem autolytischen Prozeß des Hauptversuchs die Färbung des Amylalkohols bedingen, geht u. a. daraus hervor, daß sie in der mit Amylalkohol gewaschenen wäßrigen Schicht nachgewiesen werden können.

Das Resultat dieser Versuchsreihe ist somit: In den roten Blättern ist ein thermolabiles Agens vorhanden, das Anthocyanin zu hydrolysieren vermag und wohl als hydrolytisches, bzw. glukolytisches Enzym anzusprechen ist.

II. Autolyse roter Blätter-Reibgemische, Versuchsdauer 3 Tage.

1. Hauptversuch: Farbe des Reibgemisches nach Autolyse grün wie bei I, jedoch auf Säurezusatz keine Änderung; erst das Filtrat zeigte blaßrote Farbe. Filtrat mit Amylalkohol ausgeschüttelt: Amylalkohol kaum sichtbar blaßrot; erhitzt über HCl: nach 5 Minuten intensiv rot. Die wäßrige Schicht blieb nach Waschen mit Amylalkohol ganz schwach blaßrot.

2. Kontrollversuch: Das Reibgemisch wurde vor Einbringen in den Exsikkator nicht mit CaCO_3 , sondern mit 1%iger Schwefelsäure versetzt, derart, daß der Schwefelsäuregehalt des Gemisches unter der Annahme, daß eine homogene Lösung vorgelegen hätte, 0,2 % betrug. Die Farbe des Gemisches war nach Abbrechen des Versuchs so rot wie am Anfang; Filtrat schön rot, mit Amylalkohol ausgeschüttelt: Amylalkohol ganz schwach rosa, erhitzt über HCl : blaßrot. Die wäßrige Schicht blieb nach Waschen mit Amylalkohol unverändert schön rot.

Das vollständig unverändert gebliebene Anthocyanin des Versuchs 2 wurde hydrolysiert und in 5 ccm Amylalkohol aufgenommen. Der kolorimetrische Vergleich dieser Anthocyanidmenge mit der auf autolytischem Wege erhaltenen fiel genau so aus wie bei I, und zwar gaben 3 verschiedene Versuchsportionen dasselbe Resultat.

Der Hauptversuch der II. Reihe unterscheidet sich von dem der I. Reihe dadurch, daß der größte Teil des abgespaltenen Anthocyanidins der Isomerisierung zur Pseudobase anheimgefallen ist. Daß der Anteil an Pseudobase nur zum geringsten Teil schon in den lebenden Blättern vorhanden war, zeigt der Kontrollversuch mit Säurezusatz, dessen amyalkoholische Lösung einen nur geringen Gehalt an Anthocyanidin besaß, so daß die quantitative Beurteilung der autolytischen Spaltung dadurch unbeeinflusst blieb. Infolgedessen konnte hier die Abhängigkeit der Farbstoffregeneration autolytisch abgespaltenen und zur Pseudobase umgewandelten Anthocyanidins von der Gegenwart von HCl geprüft werden. Es ergab sich, daß Erhitzen mit Schwefelsäure keine Rotfärbung, sondern Vertiefung des gelben Farbtons hervorruft, so daß sich der Farbstoff auch in diesem Punkte wie das in den lebenden Blättern schon vorhandene Anthocyanidin verhält.

Die stärkere Isomerisierung in der II. Reihe gegenüber der I. ist wohl durch den um einen Tag verlängerten Aufenthalt des Farbstoffs in neutraler Lösung bedingt. Jedoch scheinen hier auch noch andere Verhältnisse mitzuwirken, da in andern hier nicht angeführten Versuchen die Stärke der Isomerisierung auch bei gleich langen Versuchszeiten ziemlich verschieden war.

Die Tatsache, daß die Hydrolyse des Anthocyanins durch ganz verdünnte Säure gehemmt wird, ist ein weiterer Beweis für die Tätigkeit eines glukolytischen Enzyms.

III. Autolyse von Reibgemischen aus Blättern im Stadium der Entrötung. Versuchsdauer 2 Tage.

Die Versuche ergaben dasselbe Resultat, nur war der Anthocyanidingehalt des Filtrats entsprechend dem kleineren Anthocyaningehalt der frischen Blätter geringer; Anthocyanin war überhaupt nicht mehr vorhanden.

IV. Autolyse von Reibgemischen grüner Blätter. Versuchsdauer 3 Tage.

Aus Gründen, die aus den später zu beschreibenden Versuchen mit *Paeonia* ersichtlich werden, war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß ein Teil, oder sogar der ganze bei der Autolyse entstehende Anthocyanidingehalt nicht vom Anthocyan herrührt, sondern aus einer unbekanntnn Vorstufe durch Reduktion entsteht und daß das Verschwinden des Anthocyanins auf anderweitiger Zerstörung eventl. ebenfalls durch Reduktion beruht. Deshalb wurden Autolyseversuche unter denselben Bedingungen mit ganz jungen, rein grünen und mit ausgewachsenen grünen Blättern angestellt. Es kam hier jedoch nie zu einem Auftreten von Anthocyanidin in stärkeren Mengen, als es dem Anthocyanidingehalt der lebenden, zuvor daraufhin untersuchten Blätter entsprochen hätte.

V. Das Vorhandensein des Enzyms in ausgewachsenen, rein grünen Blättern.

Um festzustellen, ob das Enzym nur einen Bestandteil der anthocyaninhaltigen Blätter bildet oder auch in rein grünen Blättern vorhanden ist, wurde folgender Versuch unternommen.

15 g junge, stark rote Polygonumblätter wurden mit wenig Leitungswasser unter CaCO_3 und Thymolzusatz zu einem Brei zerrieben und in drei gleiche Portionen geteilt, die folgendermaßen weiterbehandelt wurden;

I. Rotes Reibgemisch zwei Minuten in Wasser von 100° gehalten, nach Abkühlen mit der gleichen Menge Reibgemisch aus grünen ausgewachsenen Blättern innig vermengt.

II. Beide Gemische vermischt und zusammen zwei Minuten in Wasser von 100° gehalten.

III. Rotes Reibgemisch allein 2 Minuten im Wasser von 100° gehalten.

Diese drei Portionen wurden zwei Tage in Stickstoffatmosphäre in Zimmertemperatur gehalten. Nach Ansäuern und Filtrieren waren alle Filtrate annähernd gleich stark rot (auf gleiches Volumen gebracht). Die amylnalkoholischen Auszüge verhielten sich jedoch verschieden; der Auszug der Portion I war hellrot gefärbt, derjenige der Portion II gelb, derjenige der Portion III gelblich. Erhitzt über HCl erhöhte sich der Farbgehalt von I; II und III wurden ebenfalls hellrot, blieben aber im Farbgehalt hinter I deutlich zurück. Der Farbgehalt von II und III entsprach ganz dem Farbgehalt vor dem Ansetzen des Versuchs untersuchter frischer Kontrollportionen.

Es ist also in den grünen Blättern tatsächlich anthocyanin-spaltendes Enzym vorhanden gewesen. Seine Menge scheint jedoch geringer zu sein als in roten Blättern, wenn nicht die Verschiedenheit darauf beruht, daß bei der Vermengung von rotem, fermentfreiem mit farbstofffreiem, fermenthaltigen Gemisch keine so innige Berührung zwischen Farbstoff und Enzym zustande kommt, wie in einem beide Komponenten von Hause aus enthaltenden Gemisch.

VI. Autolyse roter Blätter-Reibgemische in Gegenwart von Sauerstoff.

Die folgenden Versuche zeigen, daß ein vollkommener Ausschluß des Sauerstoffs für den Nachweis fermentativ abgespaltenen Anthocyanidins notwendig ist.

Werden die Reibgemische unter CaCO_3 - und Thymolzusatz mit großer Oberfläche der Autolyse bei Zimmertemperatur an der Luft überlassen, so weisen abfiltrierte und angesäuerte Stichproben nach 7 Stunden nur noch geringe Mengen Anthocyanin auf, nach 24 Stunden ist das angesäuerte Filtrat gelbbraun. Wird das Autolysat nach 24 Stunden mit Amylnalkohol ausgeschüttelt, so resultiert ein leicht gelber Amylnalkohol, der beim Erhitzen kaum sichtbar rosa wird, jedoch bei vorsichtiger Reduktion in Eiswasser farblos und bei darauffolgendem Erhitzen

hellrot wird. Es liegt also, soweit Anthocyanidin in Frage kommt, hier ein ähnlicher Fall vor, wie es im Abschnitt C beim Überwiegen der Oxydation über die Reduktion an lebenden Blättern gefunden worden ist. Zwei weitere amyalkoholische Ausschüttelungen lieferten so gut wie keinen Farbstoff mehr. Die ausgewaschene gelbbraune wäßrige Schicht gibt nach der Hydrolyse an Amylalkohol intensiv braunroten Farbstoff ab, der sich zu rein hellrotem Farbstoff reduzieren läßt. Dies ist merkwürdig, da der früher beschriebene braune Farbstoff, der aus frischen Blättern erhalten werden kann, sich nicht reduzieren läßt. Es scheint daher, daß dieser Farbstoff durch die postmortale Oxydation zerstört worden ist und daß das zu gelbbraunem Farbstoff oxydierte Anthocyanin nach 24 Stunden Autolyse noch teilweise mittelst Reduktion regeneriert werden kann.

2 bis 3 Tage alte Autolysate gaben an Amylalkohol große Mengen braunen Farbstoffs ab. Inzwischen ist aber wahrscheinlich stärkere Oxydation und reichlichere Hydrolyse oxydierten Anthocyanins eingetreten. Die wäßrige Schicht ist braun gefärbt und gibt nach Hydrolyse den Farbstoff quantitativ an Amylalkohol ab. Durch Reduktion konnte in keiner der Lösungen mehr roter Farbstoff erhalten werden.

Die Vorgänge wurden nicht im einzelnen verfolgt; immerhin ergibt sich aus der Anwesenheit eines braunen, erst nach Hydrolyse in Amylalkohol gehenden Farbstoffes, der in den ersten Oxydationsstadien noch zu rotem Farbstoff reduziert werden kann, daß bei den postmortalen Vorgängen an der Luft die Oxydation des Anthocyanins seiner Hydrolyse vorausgeht. (Inwieweit die Abhandlung von Nagai (The oxydation of anthocyanin, Bot. Mag. Tokyo 31, 1917) sich mit derartigen Fragen befaßt, kann Verf. zur Zeit nicht feststellen.)

Eine eingehende Untersuchung des enzymatischen Spaltungsprozesses beim Polygonum-Anthocyanin konnte natürlich nicht mit den sämtliche Stoffe des Blattes enthaltenden Reibgemischen vorgenommen werden und soll einer Gelegenheit vorbehalten sein, in der größere Materialmengen für Reindarstellung des Enzyms zur Verfügung stehen. Immerhin dient für die Cha-

rakterisierung des Enzyms als Anhaltspunkt die Tatsache, daß Emulsinzusatz zu den Reibgemischen keine Beschleunigung der Hydrolyse bewirkt.

Inwiefern das Enzym in der lebenden Pflanze zur Wirkung kommt, ist ebenfalls eine noch offene Frage. Es ist nicht gelungen, in Blättern, die 24 Stunden in N₂-Atmosphäre verweilt hatten, eine Anthocyaninspaltung nachzuweisen; länger konnte der Versuch nicht ausgedehnt werden, da sich nach dieser Zeit kleine, gelb verfärbte, abgestorbene Herde zeigten. Jedenfalls liegt auch hier ein Prozeß vor, der, in der lebenden Pflanze aufs feinste reguliert, nur in der abgetöteten Pflanze sich hemmungslos und daher in chemisch greifbarer Form abspielt.

Schlußbetrachtung.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen wäre es denkbar, daß sich der Prozeß des Anthocyanverschwindens bei *Polygonum compactum* folgendermaßen in seinen ersten Stadien abspielt: Das Anthocyanin wird mittelst eines Enzyms in Anthocyanidin und Zucker gespalten. Das Anthocyanidin isomerisiert sich zur farblosen Pseudobase; diese kann auf dem Weg der Oxydation in einen gelben Farbstoff umgewandelt werden, der seinerseits auf dem Weg der photochemischen Reduktion wieder die Pseudobase des Anthocyanidins liefern kann. Diese Vorgänge sind jedoch nicht die einzige Ursache des Auftretens der Anthocyanidinpseudobase und ihrer Oxydationsstufe; denn diese finden sich auch schon in ganz jungen Blättern, so daß sie hier bei der Anthocyaninsynthese eine Rolle spielen könnten.

II. Untersuchungen an *Paeonia*-Arten und -Varietäten.

A. Voruntersuchung.

Unter den zur Verfügung stehenden *Paeonien* befanden sich zwei, deren Anfang April über dem Boden erscheinende Blätter und Hauptachsen intensiv rot gefärbt waren: *Paeonia Wittmanniana* Hartwiss und eine Gartenform von *Paeonia officinalis* L. Die Blätter sind um diese Zeit schon ziemlich weit entwickelt, bleiben jedoch noch ca. 2 Wochen mit nach außen gekehrter Blattunterseite schopfartig aneinandergedrängt

und eng zusammengefaltet. Während dieser Zeit nimmt die Rotfärbung nur unwesentlich ab; dies tritt erst beim Entfalten der Blätter ein. In höherer Temperatur entwickeln sich die Blätter wesentlich rascher und verlieren auch die rote Farbe früher. Abgeschnittene, ins Wasser gestellte Sprosse von *P. Wittmanniana* wurden am 13. April teils in ein Warmhaus von ca. 22°, teils in einen Raum von 10—15° mit gleichen Lichtverhältnissen gebracht. Die Warmhausexemplare waren nach 14 Tagen fast vollkommen entfaltet, hatten die rote Färbung nahezu ganz verloren und zeigten ein gelbstichiges Grün, während die bei 10—15° gehaltenen Exemplare sich nach dieser Zeit nur wenig entfaltet hatten und noch tief rot gefärbt waren. Auch bei diesen Pflanzen ist das Verschwinden des Anthocyans nicht durch Verteilung des Farbstoffs auf eine größere Oberfläche bedingt, da die Blätter im Warmhaus keine wesentliche Flächenzunahme erfahren hatten. Das Verschwinden des Anthocyans stellt also auch hier einen physiologischen Prozeß dar, der durch Erwärmen beschleunigt werden kann.

Die Untersuchung des roten Farbstoffs dieser roten Blätter und der roten Blüten einer Reihe von verschiedenen *Paeonia*-pflanzen ergab in ihren Löslichkeitsverhältnissen gegenüber Amylalkohol und verdünnter Säure, daß rhamnosefreie Diglukoside vorlagen. Die chemische Konstitution wurde auch hier nicht berücksichtigt. Jedoch scheinen die hier in Betracht kommenden Diglukoside nur teilweise mit dem von Willstätter aus Paeonienblüten von Merck¹ Darmstadt dargestellten Paeonin identisch zu sein, da hie und da in amyalkoholischen Anthocyanidinlösungen nach Neutralisierung und Alkoholzusatz mit FeCl_3 eine intensiv blauviolette Färbung² erzielt werden konnte, während Paeonidin mit FeCl_3 nur schwache Reaktion giebt; außerdem war die saure amyalkoholische Lösung zumeist nicht violettrot wie beim Paeonidin, sondern rot. Die Reaktion mit verdünnter Sodalösung ist, wenigstens in den aus Blättern hergestellten Lösungen, durch das Vorhandensein von Begleitstoffen verdeckt und gab teils grüne, teils gelbe Färbung.

Saure Farbstofflösungen aus roten Blüten gaben vor dem

¹) Laut Merck's Index: *Paeonia officinalis*.

²) Vielleicht ist allerdings diese Reaktion durch begleitende Gerbstoffe bedingt.

Erhitzen schöne Blaufärbung mit Soda, dagegen nicht mehr nach Hydrolysierung mit heißer Säure. Erwähnenswert in dieser Hinsicht ist das Verhalten eines die typische Sodareaktion nach Erhitzen störenden Begleitstoffes in den tiefroten Blüten von *Paeonia decora* Anders. Die tief rote, aus dem Hydrolysat gewonnene amyalkoholische Lösung wurde mit ganz schwacher Sodalösung tropfenweise versetzt. Nachdem die Neutralisation erreicht war, traten in der wäßrigen Schicht zuerst tief blaue Wolken auf, die sofort einer intensiven Grünfärbung Platz machten; es waren also offenbar zwei Farbstoffe vorhanden. Willstätter fand, daß vorhandene Begleitstoffe mit Äther extrahiert werden können, und daß die so gereinigten Lösungen mit Soda die typische Anthocyanreaktion geben. Dieses Verfahren, zu dem mit KMnO_4 gewaschener, d. h. peroxydfreier Äther genommen wurde, führte bei diesen Blüten nicht zum Ziel. Da die Hydrolysierung an einem Extrakt vorgenommen worden war, der zuvor so lange mit Amyalkohol gewaschen wurde, bis der Amyalkohol an Soda keinen gelben Farbstoff mehr abgab, lag es nahe, an einen Begleitstoff zu denken, der im unerhitzten Extrakt ebenfalls als amyalkoholunlösliches Glukosid vorhanden ist, sich dagegen in seiner Spaltbarkeit durch heiße Säure von Anthocyan vielleicht unterscheidet. Der Extrakt wurde daher der fraktionierten Hydrolyse unterworfen und mit ca. 8% H_2SO_4 + etwas Salzsäure zunächst 4 Minuten bei 100° gehalten; beim Ausschütteln mit Amyalkohol ergab sich eine rote amyalkoholische Lösung, die sich gegen verdünnte Sodalösung wie die oben erwähnte verhielt. Hierauf wurde die noch ziemlich stark rot gefärbte wässrige Lösung nach nochmaligem Waschen mit Amyalkohol 5 weitere Minuten bei 100° gehalten; die aus dieser Fraktion erhaltene rote amyalkoholische Lösung gab mit Sodalösung eine reine Blaufärbung; die wäßrige Schicht enthielt nach der Extraktion keinen Farbstoff mehr.

Es ist somit in den untersuchten Blüten neben dem Anthocyan offenbar ein zweites Glukosid vorhanden, das in saurer Lösung und unerhitzt in alkalischer Lösung keinen besonderen Farbstoffcharakter zeigt, sich leichter als das Anthocyan hydrolysieren läßt und infolge seines Verhaltens gegen Amyalkohol und Äther den Anthocyanen sehr nahe steht, jedoch nach Er-

hitzen mit Soda Grün- oder Gelbfärbung gibt. (Die grüne Farbe könnte eine aus dem ja ebenfalls vorhandenen Anthocyanblau und Gelb resultierende Mischfarbe sein).

B. Das Vorkommen einer Oxydationsstufe des Anthocyanidins in den Paeoniapflanzen.

Die untersuchten Paeoniapflanzen unterschieden sich dadurch prinzipiell von *Polygonum compactum*, daß in ihren vegetativen Organen nie Anthocyanidin nachgewiesen werden konnte, obwohl sie wie *Polygonum* ein Chromogen enthalten können, das durch Reduktion in einen sich wie Anthocyanidin verhaltenden Farbstoff übergeführt werden kann.

Die roten Blätter von *Paeonia Wittmanniana* und der Gartenform von *P. officinalis* geben mit verdünnter Säure eine tief rote Lösung, die an Amylalkohol gelblichen Farbstoff abgibt; bei Erhitzen in Gegenwart von HCl vertieft sich die gelbe Farbe ohne Spur von Rötung, gleichgiltig bei welchen Temperatur- und Lichtverhältnissen die Blätter sich befunden hatten. Wurde die amylnalkoholische Lösung auf die im I. Teil beschriebene Weise der Reduktion bis zur Farblosigkeit unterworfen, so resultierte nach Erhitzen eine erst violette, dann hellrote Lösung, die sich gegen Soda, CaCO_3 , u. s. w. wie eine Anthocyanidinlösung verhielt und beständig war. Die Reduktion bei höherer Temperatur, ca. 30° — 40° , lieferte im Gegensatz zu *Polygonum* etwas mehr Farbstoff ohne die violette Zwischenstufe.

Ungefähr dieselbe Menge an Anthocyanidin-Oxydationsstufe ist in ausgewachsenen Blättern dieser beiden Pflanzen zu finden. Jedoch ist die Menge beträchtlich geringer als in den extremen Fällen bei *Polygonum compactum*. In gelbgrünen Blättern, die bei beiden Paeonien neben rein grünen vorkommen, ist die Oxydationsstufe dagegen reichlicher vorhanden.

Das Vorkommen der Oxydationsstufe steht mit dem Vorkommen des Anthocyanins in gewissem Zusammenhang. Eine andere Gartenform von *P. officinalis*, deren Laubblätter während der ganzen Frühjahrsentwicklung rein grün waren, lieferte nur verschwindende Mengen des Chromogens. Ebenso konnte bei

einem und demselben Individuum von *Paeonia peregrina* Miller dieser Zusammenhang erwiesen werden: einige Blätter zeichneten sich in fertig entwickeltem Zustand dadurch aus, daß die Blattränder einen deutlichen roten Saum aufwiesen und gleichzeitig die Blattspreite gelbgrün verfärbt war, während bei der Mehrzahl der Blätter der Anthocyansaum nur schwach angedeutet oder gar nicht vorhanden war und die Blattspreite rein grüne Färbung aufwies. Die gelbstichigen Blätter lieferten hellgelbe amyalkoholische Auszüge, die nach Reduktion schön rot gefärbt waren, während die Auszüge aus grünen Blättern mit weniger Anthocyangehalt auch nur verschwindende Mengen Anthocyanidin lieferten.

Es ist daher die Frage naheliegend, ob beim Verschwinden des Anthocyanins eine Anreicherung an oxydiertem Anthocyanidin festgestellt werden kann. Diese Vermutung wurde bestätigt. In den Blättern der beiden roten *Paeonia*-pflanzen, die sich im Stadium der Entrötung befanden, sei es im Freien an der lebenden Pflanze, sei es im Warmhaus an abgeschnittenen Sprossen, fand sich, unter quantitativ gleichen Verhältnissen untersucht, eine weit größere Menge der Oxydationsstufe als in den vorhergehenden oder etwas späteren Entwicklungsstadien: Die amyalkoholischen, stark gelb gefärbten Auszüge nahmen nach Reduktion bei niedrigerer Temperatur und nachherigem Erhitzen mit HCl violette Farbe an, die bei längerem Erhitzen, im ganzen ca. 5—8 Minuten, in tiefes Rot überging.

Infolgedessen ist wohl auch hier der Schluß berechtigt, daß das Verschwinden der roten Farbe in den lebenden Blättern von einer Hydrolyse des Anthocyanins und einer Oxydation des abgespaltenen Anthocyanidins zu gelbem Farbstoff bedingt ist, zumal da die Farbe der Blätter nach der Entrötung mehr gelb als grün ist. Ob vielleicht die Oxydation der Hydrolyse vorangeht, müßten weitere Untersuchungen zeigen.

Im Lauf der Entwicklung ist der gelbe Farbstoff offenbar noch weiteren Veränderungen unterworfen, da er in älteren Blättern nur noch in geringer Menge nachgewiesen werden kann, während beim Eintritt der herbstlichen Rötung, ungefähr von Anfang August an, wieder eine Anreicherung konstatiert werden kann.

Es war bei *Paeonia* nicht möglich, einen weiteren Beweis

für diese Ansicht mit Hilfe der Untersuchung postmortaler Vorgänge zu erbringen, wie späterhin ausgeführt werden wird.

Vorerst mögen noch einige an Blüten vorgenommene Untersuchungen mitgeteilt werden.

Auch in den Blüten der verschiedenen *Paeonia*-Arten und Varietäten konnte die Oxydationsstufe des Anthocyanidins nachgewiesen werden; jedoch war im Gegensatz zu den Blättern in manchen Pflanzen auch Anthocyanidin selbst, in Form seiner Pseudobase, vorhanden. Die Mengen waren sehr gering und, soweit die Oxydationsstufe in Betracht kommt, geringer als in den grünen, bezw. gelbgrünen Blättern der betreffenden Pflanze.

Es lag die Vermutung nahe, daß in Blütenknospen sich größere Mengen dieser Stoffe finden ließen; aber auch hier war der Gehalt so gering wie bei offenen Blüten. Da nun auch ganz junge Blütenknospen schon tiefrot gefärbte Petalen besitzen, scheinen diese zuckerfreien Farbstoffkomponenten für die Anthocyaninsynthese in den Blüten nicht in Betracht zu kommen. Hierauf wird in Abschnitt III bei Besprechung einiger an *Cobaea*-Blüten gemachten Beobachtungen zurückzukommen sein.

Einige der Untersuchungen seien hier mitgeteilt. Die tiefroten Blütenblätter aus geöffneten Blüten und ganz jungen Blütenknospen von *Paeonia decora* ergaben aus dem sauren tiefroten wäßrigen Auszug eine gelbliche amyalkoholische Lösung, die über HCl erhitzt oder nach längerem Stehen blaßrot, reduziert und dann erhitzt ebenso blaßrot wurde.

Es war also Anthocyanidinpseudobase und aus den Seite 577 angeführten, auch hier nachkontrollierten Gründen offenbar auch die Oxydationsstufe vorhanden. Das Verhalten der roten Lösung bei Neutralisation mit CaCO_3 und Wiederansäuern war das für Anthocyanidin typische; eine zweite amyalkoholische Ausschüttelung gab keinen Farbstoff mehr.

Anders verhielten sich die Blüten von der (im Frühjahr rotblättrigen) Gartenform von *Paeonia officinalis*. Die amyalkoholische Schicht wurde beim Erhitzen über HCl nur stärker gelb gefärbt, während nach Reduktion auf Erhitzen schön rote Farbe auftrat.

Die Blüten dieser Pflanze waren blaßrot gefärbt und gefüllt, die innersten Blütenblätter rein weiß. In diesen farblosen

Blütenblättern ließ sich kein Farbstoff, weder durch Erhitzen noch durch Reduktion nachweisen.

Bemerkenswert ist das Verhalten der gelben Blüten von *Paeonia Wittmanniana*. Der saure, gelbe Auszug aus den Blütenblättern gibt ohne vorheriges Erhitzen seinen Farbstoff quantitativ an Amylalkohol ab. Die intensiv gelbe amylnalkoholische Lösung wird nach Reduktion bei ca. 30°—40°, jedoch nicht in Eiswasser bei ca. 20° farblos oder blaßrot, nach darauffolgendem Erhitzen intensiv rot. Es stellt also hier die in den Blüten der anderen Paeonien in nur geringer Menge vorhandene gelbe Oxydationsstufe des Anthocyanidins die die Blütenfarbe bedingende Substanz dar. Die mit Amylalkohol nachgewaschene wäßrige Schicht nahm bei Reduktion keinen bestimmten Farbcharakter an; sie färbte sich beim Erhitzen mit Salzsäure nur gelblich, etwas weniger als eine nicht reduzierte Vergleichsportion. Everest¹ hat bei einer Anzahl gelber und auch weißer Blüten mittelst Reduktion rote Farbstoffe erhalten, jedoch war im Gegensatz zu *Paeonia Wittmanniana* das Reduktionsprodukt, nach seinem Verhalten gegen Amylalkohol beurteilt, eine glukosidische Verbindung. Ebenso hat Shibata² neuerdings u. a. aus gelben Blüten von *Diervillea grandiflora* S. et Z. mittelst Reduktion roten Farbstoff erhalten; jedoch ist aus dem dem Verf. z. Zt. allein zugänglichen Referat nicht zu ersehen, ob es sich um Glukoside oder zuckerfreie Verbindungen handelt.

Die Frage, ob die in den Paeonien vorhandenen Oxydationsstufen des Farbstoffs zuckerfrei sind, muß etwas näher beleuchtet werden. Es könnte ja der Fall sein, daß diese Stoffe ein Glukosid darstellen, das gegenüber Amylalkohol andere Löslichkeitsverhältnisse besitzt als Anthocyanin und daß bei dem nach der Reduktion vorgenommenen Erhitzen neben der Isomerisierung eine Hydrolyse vor sich ginge. Demgegenüber ist zu betonen, daß auch die kleine Menge Farbstoff, die schon bei 30—40° während der Reduktion auftreten kann, sich nicht im geringsten mit verdünnten Säuren aus dem Amylalkohol ausschütteln läßt.

¹) Everest, Proc. Royal Soc. 87, 1914. p. 444.

²) Shibata; Shibata und Kishida, Bot. Mag. Tokyo 39, p. 118, 301, 316 (Ref. Zentralbl. f. Phys. 32, 1917. p. 7).

C. Die Bildung eines Farbstoffs der Anthocyangruppe bei postmortalen Prozessen.

Die Untersuchung der postmortalen, mit dem Anthocyanstoffwechsel in Zusammenhang stehenden Erscheinungen bei Paeonien führte zu anderen Resultaten als es bei *Polygonum compactum* der Fall war und wie es auf Grund des Auftretens größerer Mengen einer Anthocyanidin-Oxydationsstufe bei der Entrötung der Blätter hätte erwartet werden können. Die Untersuchungsmethode war dieselbe, wie sie im I. Teil beschrieben wurde.

Eine orientierende Untersuchung an roten Blättern von *Paeonia Wittmanniana*, die nach Abtötung bei -20° zwei Tage in Wasserstoffatmosphäre mit Toluolzusatz gehalten wurden, schien für eine reichliche Abspaltung von Anthocyanidin zu sprechen. Das Autolysat lieferte einen roten Extrakt, der an Amylalkohol gelblichen Farbstoff abgab; die amylnalkoholische Lösung wurde beim Erhitzen mit Salzsäure nach 2—3 Minuten prachtvoll dunkelviolett. In Anbetracht dieser großen Farbstoffmenge war es jedoch auffallend, daß die mit Amylalkohol nachgewaschene wäßrige Lösung stark rot geblieben war. Es wurde daher zwecks kolorimetrischer Vergleichung ein Serienversuch mit quantitativ gleichen Mengen angesetzt;

Junge rote Blätter wurden mit etwas Leitungswasser und Seesand zu einem dicken Brei verrieben, in Portionen von 8 ccm in Röhrcn abgefüllt und mit Toluolzusatz 1—10 Tage unter Wasserstoff bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Abbrechen der Autolyse wurde das Reibgemisch sofort mit 8 ccm 5 %iger Schwefelsäure angesäuert, filtriert und das Filtrat mit 4 ccm Amylalkohol ausgeschüttelt. Diese Ausschüttelung wurde mit verdünnter Säure gewaschen (wobei sich die Waschflüssigkeit als absolut chromogenfrei erwies) und mit Salzsäure einige Minuten bei 100° gehalten (Amylalkohol I der f. Tabelle). Die wäßrige Schicht wurde nach mehrmaligem Waschen mit Amylalkohol mit stärkerer Schwefelsäure unter Salzsäurezusatz quantitativ hydrolisiert und mit Amylalkohol extrahiert (Amylalkohol II der f. Tabelle). Eine gleich große frische Portion des Reibgemisches wurde vor Ansetzen des Serienversuchs ebenso behandelt.

Die Resultate sind in f. Tabelle wiedergegeben:

No.	Versuchsdauer	Amylalkohol I		Amylalkohol II
		nicht erhitzt	erhitzt	
1	sofort untersucht	gelblich	gelb	dunkelrot
2	1 Tag	gelb	violett	dunkelrot
3	2 Tage	rotstichig-gelb	dunkelviolet	dunkelrot
4	3 Tage	hellrot	dunkelviolet	dunkelrot
5	5 Tage	rot	undurchsichtig violett,	rot
6	10 Tage	dunkelrot	undurchsichtig violett	hellrot

Hieraus ergibt sich folgendes Resultat:

In den jungen roten Blättern von *Paeonia Wittmanniana* entsteht bei postmortalen Prozessen unter Luftabschluß ein Stoff, der durch Erhitzen in einen intensiv gefärbten violetten Farbstoff umgewandelt wird und sich in seinen Löslichkeitsverhältnissen gegenüber Amylalkohol und verdünnter Säure wie ein Anthocyanidin verhält. Das Auftreten dieses Stoffs steht nicht in Zusammenhang mit der Spaltung des vorhandenen Anthocyanins; dieses wird erst nach ca. 3 Tagen in geringem, nach 5—10 Tagen in stärkerem Maß hydrolysiert. Dabei geht die Bildung des violetten Farbstoffs offenbar weiter vor sich, da die rote Färbung des Amylalkohols gegen die bei Erhitzen eintretende Violettfärbung nicht aufzukommen vermag.

Auf welche Ursache die langsam einsetzende Hydrolyse des Anthocyanins zurückzuführen ist, wurde bis jetzt nicht weiter verfolgt. Die weitere Untersuchung befaßte sich lediglich mit dem violetten Farbstoff.

Ein weiterer Beweis für die Verschiedenheit der beiden Vorgänge ergibt sich aus folgendem Versuch.

Die dicken Hauptachsen der jungen Triebe von *Paeonia Wittmanniana* lassen sich durch Abziehen der äußersten Schichten leicht des Anthocyanins berauben. Saure Auszüge aus derartig präparierten Stengeln waren leicht gelb gefärbt

und gaben nach Erhitzen mit HCl an Amylalkohol gelben Farbstoff ab, der auch bei Fortdauer des Erhitzens nie in violett umschlug. Es ist also weder Anthocyanidin- noch Anthocyaninpseudobase vorhanden. Wurden dagegen die Stengelstücke, sei es in toto abgetötet bei -20° , sei es in zerriebenem Zustand 2 Tage lang in Gegenwart von Toluol in Stickstoff- oder Wasserstoffatmosphäre gehalten, so trat schon beim Versetzen des Autolysats mit Säure eine deutliche Violettfärbung auf, die beim Ausschütteln mit Amylalkohol quantitativ in diesen überging und sich beim Erhitzen zu intensiver Violettfärbung steigerte. Eine nicht erhitzte amyalkoholische Lösung die bei Zimmertemperatur über Säure stehen gelassen wurde, war nach ca. 24 Std. so stark violett wie die erhitzte Portion. Wiederholte Ausschüttelungen des sauren wäßrigen Auszugs ergaben in absteigendem Maße beim Erhitzen noch weitere beträchtliche Mengen des Farbstoffs, so daß aus 8 g frischen Stengelstücken 15 ccm eines tief violettgefärbten Amylalkohol-auszugs erhalten wurden. Wurden die wäßrigen sauren Auszüge ohne vorherige Amylalkoholausschüttelung erhitzt, so trat ebenfalls starke Violettfärbung ein und zwar gleich rasch bei Luftzutritt wie bei hoher Überschichtung mit luftfreiem Paraffinöl. Die mit angesäuertem Wasser ausgewaschene amyalkoholische Lösung, die an die Waschflüssigkeit keine Spur des Farbstoffs abgibt, wird mit verdünnter Sodalösung geschüttelt farblos, während die Soda intensiv gelbgrün gefärbt wird; nach Ansäuern geht der Farbstoff wieder in Amylalkohol, jedoch nicht mehr violett, sondern rot.

Über die allgemeinen Versuchsbedingungen ist zu bemerken, daß mit CaCO_3 versetzte Reibgemische etwas mehr Farbstoff als durch Erfrieren abgetötete, ohne CaCO_3 in toto der Autolyse unterworfenen Organe liefern und daß die Abtötung durch Erfrieren gegenüber der mechanischen Destruktion durch Zerreiben keine Vorteile zu bieten scheint. Thymol- und Toluolzusatz gaben dieselben Resultate. Der Einfluß der Temperatur wurde nicht näher untersucht, jedoch scheint zwischen der Einwirkung von Zimmertemperatur und Temperatur von 37° kein großer Unterschied zu bestehen. Wurden die Reibgemische vor dem Einbringen in sauerstofffreien Raum eine Minute in siedendes

Wasser gehalten, so lieferten sie noch einigen violetten Farbstoff, wurden sie 2—3 Minuten auf die gleiche Weise behandelt, so resultierte nachher nur ein gelber Farbstoff.

Es ergibt sich also aus diesen Versuchen folgendes: In den jungen Hauptachsen von *Paeonia Wittmanniana* ist in räumlicher Trennung vom Anthocyan und in noch größerer Menge als in den Blättern eine farblose oder leicht gelb gefärbte Substanz vorhanden, die bei autolytischen Prozessen unter Luftausschluß in eine Verbindung übergeht, die sich wie ein zur Pseudobase isomerisiertes Anthocyanidin verhält. Die Tatsache, daß schon in der Kälte auf Säurezusatz eine merkliche Violettfärbung eintritt, rührt offenbar von der hohen Konzentration der Lösung her, da Willstätter hervorhebt, daß die Isomerisation des Farbstoffs zur Pseudobase durch Verdünnung der Lösung begünstigt wird und daher die Umkehrung dieses Prozesses von denselben Umständen abhängig sein wird.

Die Frage nach der Konstitution dieses Farbstoffes muß natürlich offen bleiben, immerhin ist zu bemerken, daß er in der Farbe seiner amyalkoholischen Lösung, ebenso in der nicht auffälligen Farbreaktion mit FeCl_3 dem Paeonidin Willstätters zu vergleichen ist. Seine (wochenlange) Beständigkeit in saurer Lösung, sowie seine Unveränderlichkeit in amyalkoholischer Lösung beim Ausschütteln mit Wasser bis zur Neutralisation sprechen jedenfalls dafür, daß ein echtes Anthocyanidin, kein Allocyanidin, vorliegt.

Die jungen roten Blätter und Hauptachsen der Gartenform von *Paeonia officinalis* boten bei der Autolyse unter Luftausschluß im Prinzip dieselben Erscheinungen dar. Auch hier wurde während der ersten Tage der Autolyse kein Anthocyanidin aus dem Farbstoffglukosid abgespalten, obwohl eine beträchtliche Menge einer Anthocyanidinpseudobase schon nach 24 Std. entstanden war. Dieser Farbstoff verhielt sich jedoch verschieden von dem bei *Paeonia Wittmanniana* erhaltenen.

Die nach ein bis zwei Minuten langem Erhitzen auftretende, intensive Violettfärbung schlug bei weiterem Erhitzen in schönes Rot um (nach ca. 5 Minuten). Worauf dies beruht, konnte

nicht untersucht werden; es wäre möglich, daß diese Verfärbung einer durch das Erhitzen bewirkten Oxydation oder etwa einer Abspaltung vorhandener Methylgruppen zuzuschreiben ist. In allen andern Punkten verhielt sich der Farbstoff wie der bei *Paeonia Wittmanniana* erhaltene, nur war die FeCl_3 -Reaktion offenbar durch Begleitstoffe gestört.

Obwohl diese Anthocyanidine nicht aus dem vorhandenen Anthocyanidin hervorgegangen sind, besteht zwischen dem Auftreten ihrer Vorstufe und dem des Anthocyans ein Zusammenhang.

Eine andere Gartenform von *Paeonia officinalis*, die während ihrer Entwicklung kein Anthocyan bildete, lieferte aus jungen, der Autolyse unterworfenen Organen in 2 Versuchen keine, in einem Versuch eine kaum merkliche Farbstoffmenge, die ebenfalls von violett nach rot umschlug. Ebenso lieferte die *Paeonia peregrina*-Pflanze, die nur wenig Anthocyan gebildet hatte, in den jungen Organen nur wenig, von violett nach rot umschlagenden Farbstoff. Andererseits lieferten ausgewachsene, rein grüne und auch gelbstichige Blätter von *Paeonia Wittmanniana* nur gelben Farbstoff, während aus den rot gefärbten Herbstblättern dieser Pflanze wiederum so viel violetter Farbstoff wie im Frühjahr erhalten werden konnte.

Es scheint daher das Auftreten der Farbvorstufe eine Parallelerscheinung zur Anthocyanbildung zu sein. Infolgedessen wurde geprüft, ob auch bei der Entwicklung der Blüten diese Vorstufe sich einstellt. Jedoch verliefen die mit Blütenknospen und offenen Blüten von vier verschiedenen *Paeonia*-pflanzen angestellten Autolyse-Versuche negativ. Es wurde im Verlauf von 3 Tagen weder Anthocyanin gespalten, noch trat die gesuchte Farbstoffvorstufe auf. Die geringe Menge Farbstoff, die evtl. in der amyalkoholischen Ausschüttelung nach Erhitzen angetroffen wurde, entsprach genau der bei der betreffenden Blüte aus frischen Petalen erhaltenen Farbstoffmenge. Daraus geht hervor, daß die Pseudobase dieses Farbstoffs während der Autolyse keine Veränderung erfährt. Dasselbe gilt übrigens auch für die etwa vorhandene Oxydationsstufe des Farbstoffs.

Wie ist nun das Entstehen dieser Anthocyanidine unter den Umständen der Autolyse bei Sauerstoffausschluß zu erklären?

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, daß in den frischen Blättern der beiden roten Paeoniapflanzen ein Chromogen vorhanden ist, das reduziert bei 10—20° schon während der Reduktion hellrot, beim Erhitzen nach Reduktion stärker rot wurde, während bei Reduktion in Eiswasser eine farblose Lösung resultierte, die beim Erhitzen über violett nach hellrot umschlug. Der Ausfall der violetten Stufe bei der ersten Reduktionsart rührt offenbar von der durch die Reduktion erzeugten, nicht abgeleiteten Reaktionswärme her. Die Umwandlungen des Chromogens mittelst Reduktion in Eiswasser bis zum Auftreten des roten Farbstoffs nach Erhitzen entsprechen also ganz den Umwandlungen, die das Chromogen der Gartenform von *Paeonia officinalis* in der Autolyse und bei nachherigem Erhitzen erfährt. Dasselbe ist bei *Paeonia Wittmanniana* der Fall, nur daß hier die Umwandlung der in der Autolyse entstehenden Pseudobase auch nach längerem Erhitzen, im Gegensatz zum Reduktionsprodukt aus der lebenden Pflanze, bei der violetten Farbe stehen bleibt. (Es sei dahingestellt, ob der nach Alkalisierung und Wiederansäuern eintretende Umschlag nach rot einen analogen Prozeß darstellt.)

Nun besitzen bekanntlich lebende und abgetötete tierische und pflanzliche Gewebe eine beträchtliche Reduktionsfähigkeit. Soweit höhere Pflanzen in Betracht kommen, wurde die Reduktionsfähigkeit von Kartoffelreißsaft gegenüber Nitraten von Kastle und Elvove¹ genauer studiert; ferner fand Wolff², daß Brei von der Apfelfrucht, der an der Luft braunen Farbstoff gebildet hatte, bei Sauerstoffabschluß den Farbstoff wieder verliert.

Es ist daher mit Sicherheit anzunehmen, daß bei der Autolyse der Paeoniablätter und -Stengel bei Luftabschluß eine Reduktion einer Farbstoffvorstufe zur Farbstoffpseudobase stattfindet, die sich gemäß ihrem nichtglukosidischen Charakter erst beim Erhitzen in den Anthocyanidinfarbstoff umwandelt, soweit die Lösung nicht konzentriert ist. Ob diese Re-

¹) Kastle und Elvove, Amer. chem. Journ. **31**, 1904. p. 606.

²) Wolff, Compt. rend. **158**, 1914. p. 1125.

duktion enzymatischer Natur ist oder auf der Anwesenheit leicht oxydierbarer, chemisch definierter Substanzen beruht, ist die Aufgabe weiterer Untersuchung. Die Natur der Reduktions-tätigkeit der Gewebe liegt ja noch ziemlich im Dunkel. Die Aufhebung der Reduktion durch Erhitzen liefert keinen Beweis für die Tätigkeit einer Reduktase, da ja die zu reduzierende Substanz selbst durch das Erhitzen angegriffen werden könnte — eine Überlegung die bei der Untersuchung des enzymatischen Charakters der Polygonum-Anthocyanin-Hydrolyse wegfiel, da dort die Integrität des Ausgangsprodukts nach Erhitzen festgestellt werden konnte —.

Auf jeden Fall ist die Möglichkeit einer Reduktion durch Substanzen zu erwägen, wie sie von Heffter¹ und Straßner² für die Reduktion von Methylenblau durch Gewebe verantwortlich gemacht werden, Substanzen mit Sulfhydryl-Gruppen (z. B. Cystein), die — allerdings längere Zeit — gekocht in ihrer reduzierenden Wirkung geschwächt werden.

Zwischen den Befunden bei der postmortalen Reduktion und den durch Reduktion in vitro erhaltenen Resultaten besteht insofern ein Unterschied, als die Auszüge aus frischen Organen bedeutend weniger Farbstoff lieferten als die Autolysate; außerdem waren bei *Paeonia Wittmanniana* die auf die beiden Arten erhaltenen Farbstoffe von verschiedener Färbung; zum dritten war die Ausbeute an Farbstoff bei der Autolyse in weit höherem Grade vom Entwicklungsstadium der Organe abhängig als bei der Reduktion in vitro; viertens war das Chromogen, das aus frischen Organen gewonnen und durch Erhitzen in Farbstoff übergeführt wurde, auch in Autolysaten, noch vorhanden.

Alle diese Gründe sprechen dafür, daß hier zwei verschiedene Chromogene vorliegen. Es liegt nun die Vermutung nahe, daß ebenso wie die als Pseudobase oder Oxydationsstufe vorhandene geringe Anthocyanidinmenge einen Begleitstoff des glukosidischen Anthocyans darstellt, auch die geringe zuckerfreie Chromogenmenge nur einen Begleitstoff einer beträchtlichen

¹) Heffter, Med. nat. Arch. 1, Heft 1.

²) Straßner, Biochem. Zeitschr. 29, 1910. p. 295.

Menge glukosidischen Chromogens ausmacht und daß dieses Glukosid als die Quelle des bei der Autolyse auftretenden starken Gehalts an Farbstoffpseudobase anzusprechen ist.

Für das Vorhandensein eines solchen Glukosids spricht die Tatsache, daß die mehrmals gewaschenen, sauren Auszüge aus frischen, geschälten Stengeln der betreffenden beiden jungen Paeoniapflanzen sich beim Erhitzen hellgelb färben und den Farbstoff nach längerem Erhitzen (10 Min.) quantitativ an Amylalkohol und aus diesem an verdünnte Sodalösung mit intensiv gelber Farbe abgeben.

Es ist nun in der Tat gelungen, in einigen Versuchen glukosidischen Farbstoff zu erhalten.

Durch Schälen von Anthocyan befreite, schon ziemlich alte Stengel der Gartenform von *Paeonia officinalis* ergaben nach 3tägiger Autolyse einen farblosen Auszug, der angesäuert sofort schwach violett wurde. Die erste Amylalkohol-Ausschüttelung war gelblich und wurde nach Erhitzen über HCl hellviolett, dann rosa; eine zweite Ausschüttelung blieb farblos; die wäßrige Schicht blieb bei fortgesetztem Waschen mit Amylalkohol jedoch immer gleich violett und wurde dann mit stärkerer Salzsäure 8 Minuten bei 100° gehalten, worauf der Farbstoff quantitativ, jedoch violett bleibend, in Amylalkohol überging.

Auch in Autolysaten jüngerer geschälter Stengel, die große Mengen zuckerfreien Farbstoffs lieferten, war hie und da eine geringe Menge des Farbstoffglukosides vorhanden.

Demnach beruht offenbar die Anthocyanidinbildung bei der Autolyse auf einem hydrolytischen und einem Reduktionsprozeß derart, daß zumeist die Hydrolyse der Reduktion vorangeht. Über die damit zusammenhängenden Fragen sollen noch weitere Untersuchungen angestellt werden.

In lebenden Blättern, die drei Tage (bei *Paeonia Wittmanniana*) in N₂-Atmosphäre ohne sichtliche Schädigung gehalten werden konnten, ließen sich so wenig wie bei *Polygonum compactum* irgendwelche, den autolytischen Farbbildungsprozessen analoge Erscheinungen nachweisen. Es stellt also

auch hier das reduktionsfähige Chromogen keine für den Stoffwechsel in Betracht kommende direkte Sauerstoffquelle dar.

Autolyse bei Gegenwart von Sauerstoff.

Wurden die Autolyse-Versuche bei Gegenwart von Luft vorgenommen, so ergaben sich in allen Fällen, wie bei *Polygonum* mehr oder weniger braun gefärbte, teils amyalkohollösliche, teils amyalkoholunlösliche Farbstoffe, die je nach der Stärke des oxydierenden Eingriffs bei künstlicher Reduktion keinen oder noch einen gewissen Teil des ursprünglichen Farbstoffs zurücklieferten.

Vergleichende Betrachtung der hauptsächlich, bei *Polygonum compactum* und den Paeonien erhaltenen Befunde.

Es wurde gezeigt, daß *Polygonum compactum* in jungen und ausgewachsenen Blättern eine beträchtliche Menge Anthocyanidin, bzw. Oxydationsstufe dieses Farbstoffs enthält, während die vegetativen Organe der untersuchten Paeonien nur in jungen anthocyanhaltigen oder ebensolchen älteren Stadien eine relativ geringe Menge der Oxydationsstufe eines Anthocyanidins ohne die Farbstoffpseudobase selbst aufweisen. Nun ist bemerkenswert, daß auch die rein grünen Blätter der Polygonaceen auf Einwirkung von Verwundung, Knickung des Blattstiels usw. sehr rasch mit reichlicher Anthocyanbildung reagieren, wie auch bei *Polygonum compactum* im speziellen festgestellt wurde; andererseits wurde festgestellt, daß die Paeonienblätter auf derartige Einwirkungen ebenfalls, jedoch weit schwächer und langsamer Anthocyan bilden.

Es ist sehr wohl möglich, diesen Unterschied darauf zurückzuführen, daß *Polygonum compactum* eine größere Menge Anthocyanidin oder seiner leicht in den Farbstoff umwandelbaren Oxydationsstufe im Vorrat hat, während bei den Paeonien dieser Stoff erst aus irgendwelchen ursprünglicheren Verbindungen hergestellt werden muß. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob die Anthocyanbildung durch äußere Einflüsse auch bei anderen Pflanzen zum Vorhandensein präformierten Anthocyanidins in Beziehung steht.

Ein weiterer Unterschied ist dadurch gegeben, daß bei *Polygonum compactum* eine enzymatische Hydrolyse des Anthocyans gelang, während die Paeonien wenigstens innerhalb 3—4 Tagen diese Erscheinung nicht boten. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß bei den Paeonien eine Hydrolyse des Anthocyans in vivo überhaupt nicht stattfindet; möglicherweise lassen sich noch Versuchsbedingungen finden, bei denen ein derartiger Prozeß sich greifen läßt. Immerhin ist merkwürdig, daß *Polygonum compactum* bis jetzt die einzige von zahlreichen untersuchten Pflanzen darstellt, bei der eine in wenigen Tagen sich abspielende Anthocyaninhydrolyse festgestellt werden konnte.

Andererseits ließ sich bei *Paeonia* unter den Bedingungen der Autolyse das Auftreten eines zweiten Anthocyanfarbstoffs nachweisen, während *Polygonum compactum* keinen derartigen Farbstoff lieferte. Jedoch ist das hierfür verantwortlich zu machende Chromogen nicht auf die Paeonien beschränkt; so konnte u. a. aus jüngeren roten, durch Schälen von Anthocyan befreiten Blattstielen von *Ligusticum*, einer Umbellifere, derselbe violette Farbstoff unter den Bedingungen der Autolyse bei Luftabschluß erhalten werden.

Über den chemischen Charakter der in *Polygonum compactum* und den Paeonien vorhandenen Stoffe, die durch Reduktion in Farbstoffe der Anthocyangruppe übergeführt werden können, wurden noch keine Untersuchungen angestellt. Die Grünfärbung, die die Extrakte dieser Pflanzen mit FeCl_3 geben, weist zwar auf das Vorhandensein von Stoffen wie Quercetin, Rutin u. s. w. hin, jedoch wäre es in Anbetracht der Leichtigkeit, mit der sich bei Paeonien auf dem Wege postmortaler Reduktion ein roter Farbstoff erhalten läßt, leicht möglich, daß zwischen Flavonen und Anthocyanen noch Oxydationszwischenstufen vorhanden sind. Tatsache ist, daß neben den Anthocyanen sowohl in den Paeonien als in *Polygonum compactum* Substanzen ohne besonderen Farbcharakter vorhanden sind, die sich gegen Äther und gegen Amylalkohol vor und nach Erhitzen mit Säure wie Anthocyane verhalten. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß Willstätter¹, bis jetzt in vorläufiger Weise, von der Existenz eines gelben Farbstoffs in

¹) Willstätter, und Weil, Liebigs Annalen. 412, 1916. p. 231.

Mohnblüten berichtet, der »dem Anthocyan im wesentlichen analog ist«. Auf alle Fälle muß es sich um Stoffe handeln, die dem betreffenden Anthocyan gegenüber eine höhere Oxydationsstufe darstellen.

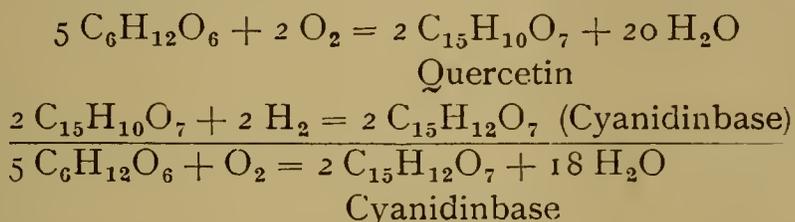
Theoretisches zur Frage der Anthocyanbildung.

Wenn durch die Untersuchungen Willstätter's am Quercetin, durch diejenigen von Everest an verschiedenen gelben Blütenfarbstoffen und durch vorliegende Arbeit erwiesen ist, daß die Anthocyanbildung in ihrem letzten Stadium einen Reduktionsprozeß darstellt, so ist damit noch nicht gesagt, daß sich dieser Prozeß in allen Fällen scharf absetzt von den vorbereitenden Prozessen konstitutiver Natur, d. h. es braucht wohl nicht immer ein Vorrat von flavonartigen Stoffen in der Pflanze angehäuft zu werden, ehe Anthocyanbildung erfolgt. Im vorhergehenden Abschnitt wurde versucht, diesen Punkt zur Erklärung des Geschwindigkeitsunterschieds heranzuziehen, der sich bei verschiedenen Pflanzen in der Anthocyanbildung auf äußere Reize hin geltend macht. Auf keinen Fall wird mit der Feststellung von Reduktionsvorgängen an Chromogenen der Kernpunkt der Frage nach der Anthocyanbildung getroffen, auch nicht, wenn diese Chromogene chemisch definierbare Substanzen darstellen.

In dieser Hinsicht sind die Untersuchungen von Combes¹ über den Gesamtgaswechsel von Blättern während der Anthocyanbildung und -zerstörung beachtenswert. Combes fand, daß z. B. in Blättern von *Ampelopsis hederacea* im Stadium der Anthocyanbildung die Oxydationsprozesse gegenüber grünen Blättern leicht gesteigert sind und daß von jungen Blättern (*Ailanthus*) beim Verschwinden des Anthocyans im Frühjahr mehr Sauerstoff abgegeben wird, als es bei möglichst gleichaltrigen, schon rein grünen Blättern der Fall ist. Vorausgesetzt, daß es berechtigt ist, diese Alteration des Gaswechsels direkt mit dem Anthocyanstoffwechsel in Beziehung zu bringen, so sind diese Befunde den Untersuchungen am Anthocyan selbst direkt zuwiderlaufend im Fall, daß nur

¹) Combes, Rev. gén. de Bot. 22, 1910. p. 177.

das Endglied der Farbstoffbildung, bzw. das Anfangsglied der Farbstoffzerstörung betrachtet wird. — Combes selbst hat späterhin gerade in grünen Blättern von *Ampelopsis hederacea* ein Chromogen nachgewiesen, das bei der Reduktion einen Farbstoff der Anthocyangruppe liefert. (vgl. Abschn. IV.) — Wenn dagegen in rein theoretischer Weise die Anthocyanbildung in ihrem Gesamtverlauf als vom Zucker ausgehend in Rechnung gestellt wird, so ist tatsächlich in der Bilanz ein Plus auf Seiten der Oxydationsprozesse. Dies gilt für alle bis jetzt bekannten Anthocyane mit Ausnahme des sauerstoffärmsten des Pelargonidins, bei dessen aus Zucker angenommener Entstehung Oxydation und Reduktion sich aufhebt. Für die Quercetin-Cyanidinbildung wären ff. Gleichungen anzusetzen:



Bei sauerstoffreicheren Anthocyanen, z. B. dem Delphinidin ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_8$), ist der Sauerstoffverbrauch bei der Bildung natürlich größer.

Es wäre wohl denkbar, daß sich diese Vorgänge, evtl. im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen Anreicherung an Flavonen, im Gaswechsel der Pflanze ausdrücken könnten, eine Frage, die unter Berücksichtigung der entstehenden Anthocyan- und Flavonmengen wohl eine Untersuchung lohnt. Ob und wie die Vorgänge bei der Anthocyanzerstörung sich in diesen Rahmen fügen, kann mangels jeglicher Kenntnis über das weitere Verhalten der aus dem Farbstoff gebildeten Oxydationsprodukte noch nicht entschieden werden.

Auf die Theorie, in der die Anthocyanbildung als eine Oxydation von Chromogenen aufgefaßt wird und die besonders von Miß Wheldale¹ vertreten wurde, braucht hier nicht eingegangen zu werden, da diese Ansichten keine chemische Grundlage besitzen und schon von Willstätter und von Everest² eine Ablehnung erfahren haben.

¹) Wheldale, u. a., Proc. Phil. Soc. Cambr. 15, 1909. p. 137.

²) Everest. l. c.

III. Die physiologische Bedeutung der Isomerisation der Anthocyanine.

A. Allgemeines.

Einige bei den beschriebenen Autolyseversuchen gemachte Beobachtungen gaben Veranlassung, der Eigenschaft der Isomerisation auch bei glukosidischen Anthocyanen einige Aufmerksamkeit zu widmen.

Die Reibgemische und die nicht mechanisch zerstörten roten Organe von *Polygonum compactum* und den Paeonien verloren bei Luftabschluß auch ohne Gegenwart von CaCO_3 die rote Farbe, so daß bei Blättern die chlorophyllgrüne, bei Blüten rein weiße Färbung zutage trat. Dies beruht nicht auf einer Reduktion des Farbstoffs zur Leukobase, sondern ist als Isomerisation zu betrachten, da schon auf ganz geringen Säurezusatz die rote Farbe sofort in voller Stärke wieder auftritt. Da nun die Isomerisation nur in neutraler Lösung vor sich geht, ist diese Erscheinung wohl so zu erklären, daß bei der Autolyse eine Vermengung der verschiedenen Zellinhalte stattfindet und durch Vereinigung des plasmaarmen, eben durch seine Rotfärbung sich als säurehaltig erweisenden Farbstoffzelleninhalts mit dem plasmareichen und daher im ganzen schwach alkalisch reagierenden Inhalt der übrigen Gewebszellen ein annähernd neutrales Gemenge resultiert, das der Isomerisation des Farbstoffs zur Pseudobase günstig ist. Bemerkenswerterweise findet keine Abblassung statt, wenn die Gemische vor Einbringen in die sauerstofffreie Atmosphäre erhitzt werden; es scheinen also beim Erhitzen der Organe saure Verbindungsgruppen in Freiheit gesetzt zu werden; jedoch könnte dieser Befund auch aus der Zerstörung eines die Umwandlung des Farbstoffs zur Pseudobase befördernden Enzyms erklärt werden, worüber weitere Untersuchungen anzustellen wären.

Dieses Verhalten wurde auch bei einer ganzen Reihe von Blüten aus den verschiedensten Familien festgestellt, aber nicht bei *Delphinium Consolida*, deren Blüten dauernd blau blieben; und eben das von Willstätter aus dieser Blüte gewonnene Delphinin zeichnet sich dadurch vor den andern Anthocyanen aus, daß es sich nicht zur Pseudobase isomerisiert.

Manche roten Blütenblätter wurden unter Luftabschluß nicht weiß, sondern violett; ein weiterer Beweis dafür, daß die Farbänderung von den oben geschilderten Umständen herrührt.

Somit kann auch die in lebenden Organen unter Umständen sich einstellende Farbänderung des Anthocyans in sichererer Weise, als es vor der Kenntnis der Isomerisierbarkeit des chemisch reinen Farbstoffs möglich war, als Indikation für Reaktionsänderungen im Zellsaft — natürlich nicht im Protoplasma — verwandt werden. Denn gerade diese Art der Anthocyanentfärbung bot naturgemäß ohne die Kenntnis ihrer Ursache ein mit mehr oder minder begründeten Hypothesen bearbeitetes Hindernis bei der Untersuchung.

Unter diesen Gesichtspunkt sind die Untersuchungen Fitting's¹ an Erodiumblüten, die vor den Willstätter'schen Untersuchungen ausgeführt worden sind, aufzufassen; es sei hierbei betont, daß sich dieser Autor streng an die Tatsachen gehalten hat. Er stellte fest, daß eine und dieselbe Blüte von *Erodium gruinum* und *E. ciconium* bei Temperaturen bis 20° blau, bei höherer Temperatur weinrot und rosa, bei 40—42° fast farblos ist und daß Temperaturwechsel sehr rasch eine von physiologischen Reizmomenten mitbestimmte entsprechende Farbänderung hervorruft; diese Farbänderungen konnte Fitting auch an den alkoholischen Auszügen nachweisen. Er glaubt daher, daß der Farbstoff selbst diese Umwandlungen erfährt, läßt dagegen die Frage der Beteiligung von anderen Substanzen offen.

Auf Grund der jetzigen Kenntnisse von den Anthocyaninen läßt sich in Verbindung mit den in vorliegender Untersuchung gemachten Beobachtungen die Erklärung dieser Erscheinung bei *Erodium* einen Schritt weiter führen: Temperaturwechsel bedingt offenbar eine Verschiebung der H- bzw. OH-Ionenkonzentration des Zellsafts, derart, daß unter dem regulierenden Einfluß des lebenden Protoplasmas in niedriger Temperatur alkalische, in höherer saure und in noch höherer, jedoch wohl schon plasmaschädigender Temperatur neutrale Reaktion besteht. Die Farblosigkeit bei 40—42° könnte freilich allein durch den Farbstoff bedingt sein, im Falle, daß diese Temperatur schon

¹) Fitting, Zeitschr. f. Bot. 4, 1912. p. 81.

bei annähernd neutraler Reaktion des Zellsafts zur Umwandlung in die Pseudobase genügen würde.

Reaktionsveränderung im Zellsaft und die dadurch ermöglichte Umwandlung des Anthocyanins zur Pseudobase dürfen jedoch nicht allgemein als Ursache der Farbänderung der Blüten verantwortlich gemacht werden. Dies zeigt eine gründliche, ebenfalls vor den Willstätter'schen Arbeiten erschienene Studie von Kastle und Haden¹ an *Cichorium Intybus*; die Verfasser konnten mit Sicherheit nachweisen, daß die im Lauf eines Tages vor sich gehende Ausbleichung und Braunfärbung der Blüte von der Tätigkeit einer Oxydase bedingt ist.

B. Untersuchungen an *Cobaea scandens*.

In der Literatur finden sich allenthalben Angaben über das Rotwerden noch farbloser Blüten beim Einlegen in Säure. Dies stellte z. B. Karzel² bei *Campanula medium* fest. Schnetzler³ erzielte Rötung der Paeoniakelchblätter bei Einlegen in »Ka-oxalat« (nach Ref. in Bot. Centralbl.). Eigene Versuche bewiesen, daß es sich um saures Oxalat handelt, da nur dieses, ebenso wie verdünnte Säure Rotfärbung hervorbrachte.

Für eine nähere Untersuchung erwies sich *Cobaea scandens* geeignet. Die Blüten dieser Pflanze haben bekanntlich ungefähr 2 Tage lang, vom Auseinandergehen der Kelchblätter an gerechnet, eine eigentümlich gelbgrüne, sich allmählich besonders an den Kronzipfeln verstärkende Färbung, die im Lauf von 1—2 weiteren Tagen in Blau, bei niedrigerer Temperatur in Blauviolett übergeht. Es lag nahe, bei diesen Blüten, bei denen die Größenentwicklung der Anthocyanbildung in auffallender Weise voraneilt, die Existenz einer rasch in Farbstoff sich umwandelnden Anthocyaninpseudobase anzunehmen.

An Querschnitten vom oberen Drittel der Kronröhre grüngelber Blüten zeigte sich im Mikroskop, daß die Epidermis der Außenseite und zum Teil die subepidermale Schicht grünen, teilweise körnigen Inhalt besitzt, während die Epidermis der

¹) Kastle und Haden, Amer. Chem. Journ. **46**, 1911. p. 315.

²) Karzel, Österr. bot. Ztg. **56**, 1906. p. 348.

³) Schnetzler, Les Mondes. **53**. 1880. (Ref. Bot. Centralbl. **5**. 1881. p. 103.)

Innenseite gelblich gefärbt ist; das interzellularenreiche Parenchym ist farblos. Auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure färbten sich die Epidermiszellen der Innenseite blaßrot an, während die grünen Zellen der Außenseite unverändert blieben. In den blauen Blüten ist das Anthocyan in eben diesen Zellschichten der Innen- und Außenseite enthalten.

Ebenso färben sich grüne Blüten älteren Stadiums in verdünnte Säure gelegt nur an der Innenseite blaßrot an. Der wäßrige Extrakt grüner Blüten ist je nach Alter der Blüten farblos oder grün und wird, mit ganz verdünnter Säure tropfenweise versetzt, sofort blaßrot; an Amylalkohol wird nur der grüne Farbstoff abgegeben.

Es liegt hier also ein zur Pseudobase isomerisiertes rhamnosefreies, diglukosidisches Anthocyanin vor. Der amyloalkohollösliche grüne Farbstoff ließ sich weder durch Erhitzen, noch durch Reduktion und Erhitzen in roten Farbstoff umwandeln; er ging beim Erhitzen über HCl in ein intensiveres Grün über.

Obwohl eine Anthocyaninpseudobase in den grünen Blüten vorhanden ist, so stellt sie doch nicht den Ausgangsstoff für die Blaufärbung der entwickelten Blüten dar. Werden nämlich die sauren Extrakte aus blauen Blüten und aus grünen Blüten auch in möglichst späten Entwicklungsstadien miteinander unter quantitativ gleichen Verhältnissen verglichen, so zeigt sich, daß der Farbstoffgehalt der blauen Blüten, die den Farbstoff an verdünnte Säure mit intensiver violettroter Färbung abgaben, das vielfache des Gehalts der grünen Blüten an Pseudobase beträgt.

Es wird also vor Eintritt der Blaufärbung kein Anthocyanin als Pseudobase angehäuft. Damit steht eine andere Tatsache in Übereinstimmung: Die Farbe der rein blauen Blüten ist schon vom ersten Auftreten an blau und nicht rot; würde der Farbstoff aus einer Pseudobase hervorgehen, so müßte er wohl, wenn auch nur vorübergehend, rot sein, da zur Isomerisation zum Farbstoff Säure erforderlich ist. Tatsächlich ist nun am 3. Tage der Blütenentwicklung (nach obiger Zählung) die Innenseite der Kronröhre oft rot überlaufen in einer Stärke, die dem Gehalt saurer Extrakte grüner Blüten an Anthocyanin wohl ent-

sprechen kann; auch stimmt dies Verhalten mit dem oben erwähnten Befund an grünen Blüten, die in Säure gelegt werden, überein.

Eine weitere Erklärung des raschen Auftretens der Blaufärbung ist in der Möglichkeit einer Einwanderung präformierten Farbstoffs in die Blüte gegeben, obwohl diese Vermutung an sich wenig wahrscheinlich ist. Um dies zu entscheiden, wurde an einem grünen Blütenkelch mit dem Messer ein 0,5 cm langer Schnitt geführt, der zwei Gefäßbündel quer durchtrennte; am nächsten Tage war die ganze Blüte gleichmäßig blaßviolett, nach 2 Tagen intensiv blauviolett gefärbt. Selbst die direkt oberhalb des Schnittes liegenden Partien waren so stark gefärbt wie die andern.

Ferner wurden grüne Blüten mit ebenfalls quer zur Längsachse verlaufender Schnittführung in Streifen von $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ cm Breite zerlegt; auch diese färbten sich in der feuchten Kammer nach 24 Std. violett an und waren nach 2 Tagen fast so stark gefärbt wie intakte Blüten.

Demnach scheint also das Anthocyanin in der Blüte selbst aus den verschiedenen Molekülkomplexen zusammengesetzt zu werden, wobei natürlich dem grünen Farbstoff der jungen Blüte, der offenbar flavonartigen Charakter besitzt, eine Rolle zufällt.

Von ganz anderer Seite kommt Rosé¹ zu demselben Resultat. In der Annahme, daß Anthocyan ein Glukosid ist (die Arbeiten Willstätter's waren ihm nicht bekannt), untersuchte er den Gehalt der Cobaea-Blüten an freiem und gebundenem Zucker in vier Entwicklungsstadien und fand, daß der Totalzuckergehalt vom Knospenstadium bis zum Stadium der schwach rosa gefärbten Blüte steigt und im Stadium der blauen Blüte wieder beträchtlich gesunken ist, während Glukosidzucker erst in der blauen Blüte auftritt. Die geringen Spuren glukosidischen Zuckers, die in der rosa gefärbten Blüte vorhanden sein müssen, werden der Analyse wohl entgehen. Er schließt aus seinen Versuchen gemäß der Ansicht von Combes, daß das Anthocyan nicht aus schon vorhandenen Glukosiden, sondern aus ursprünglicheren Substanzen gebildet wird.

¹) Rosé, Compt. Rend. 158, 1914. p. 955; Rev. gén. de Bot. 26, 1914. p. 257.

Es sei hier nochmals an die bei der Untersuchung der Paeoniablüten gefundenen Resultate erinnert; auch hier konnte der Gehalt der ganz jungen schon tief rot gefärbten Blütenblätter an Anthocyanidin oder seiner Oxydationsstufe nicht zur Anthocyaninbildung in Beziehung gebracht werden.

IV. Untersuchungen an einigen in der Literatur beschriebenen Chromogenen, die anthocyanartige Farbstoffe liefern.

In der Literatur ist eine Reihe von anthocyanartigen Farbstoffen beschrieben, die in den lebenden Pflanzen nicht als Farbstoff auftreten, sondern aus einem Chromogen *in vitro* dargestellt werden können. Im folgenden soll gezeigt werden, daß diese Stoffe, analog wie die im I. Abschnitt beschriebenen Chromogene der Polygonaceen, mit Hilfe der von Willstätter angewandten qualitativen Untersuchungsmethoden sich etwas näher charakterisieren lassen und als chemisch zusammengehörend betrachtend werden können.

Laborde¹ erhitzte die Beerenhäute noch grüner Weintrauben $\frac{1}{2}$ Std, im Autoklaven bei 120° mit 2 proz. Salzsäure und erhielt roten Farbstoff. Er unterscheidet im besonderen drei Farbstoffe; einen roten, in angesäuertem Wasser löslichen, einen roten, in reinem Wasser sehr schwer, in verdünntem Alkohol leichter löslichen und einen braunen, unlöslichen Farbstoff.

Zu eigenen Versuchen standen nur blaurote, reife Trauben zur Verfügung, aus deren Häuten und Kernen getrennt Extrakte mit 5 proz. Schwefelsäure hergestellt wurden. Der amylnalkoholische Auszug aus dem roten Häute-Extrakt war nach einmaligem Waschen mit wenig verdünnter Schwefelsäure leicht gelblich gefärbt; es war also in der untersuchten Weintraube im Gegensatz zu den von Willstätter untersuchten Fällen kein Anthocyan als Monoglukosid vorhanden, ebensowenig war Anthocyanidin als Farbstoff vorhanden, wie ihn Willstätter bei einigen Traubensorten nachweisen konnte. Die Weintraube scheint in ihren verschiedenen Rassen ein sehr wechselndes Bild in der chemischen

¹) Laborde, Compt. Rend. 1908. 146, p. 1411; 1908. 147, p. 753.

Zusammensetzung ihrer Farbstoffe zu bieten, soweit die Zahl der Zuckermoleküle in Frage kommt. Wurde der amyalkoholische gewaschene Auszug mit Salzsäure erhitzt, so nahm er in wenigen Minuten eine über violett nach hellrot gehende Färbung an. Es lag also hier offenbar eine Anthocyanidinpseudobase vor.

Anders verhielten sich die gelben Extrakte, die aus einer nur geringen Anzahl (ca. 3 g) von Kernen hergestellt worden waren. Der farblose amyalkoholische Auszug wurde beim Erhitzen mit Salzsäure rasch intensiv rot und gab den Farbstoff an Soda-lösung mit blauer Farbe ab, die jedoch keine sehr starke Intensität besaß. Mit Na-Acetat ausgewaschen wurde die rote amyalkoholische Lösung intensiv violettrot, ohne an die wäßrige Schicht Farbstoff abzugeben. Es ist also auch in den Kernen, und zwar in großer Menge, eine Substanz vorhanden, die sich wie eine Anthocyanidinpseudobase verhält.

Combes¹ hat eine Reihe von Pflanzen auf das Vorhandensein anthocyanliefernder Chromogene untersucht und stellte in rein grünen Blättern von *Ampelopsis hederacea*, *Ligustrum* u. a. ein Chromogen fest, das durch Reduktion in roten Farbstoff umgewandelt wird, der sich speziell bei *Ampelopsis* verhielt wie der aus roten Blättern gewonnene Anthocyanfarbstoff. Combes hat beide Farbstoffe in isoliertem, kristallisiertem Zustand untersucht, ohne jedoch die Darstellungsweise näher anzugeben.

Die Untersuchung saurer Extrakte aus grünen Blättern von *Ampelopsis hederacea* ergab eine Bestätigung und Ergänzung der Befunde von Combes.

Die amyalkoholischen Auszüge aus den Extrakten wurden beim Erhitzen mit Salzsäure rasch intensiv rot. Das zugehörige Chromogen ließ sich der wäßrigen Lösung durch ca. 5malige Ausschüttelung mit Amyalkohol vollständig entziehen. Die ausgewaschene wäßrige Schicht ist leicht gelb gefärbt und wird beim Erhitzen mit Salzsäure tiefbraun unter Abscheidung gelbbrauner Flocken. Der in der gelben, nicht erhitzten Lösung vorhandene Stoff entspricht dem von Combes isolierten braunen Stoff; denn wenn die Lösung mit Zn und Mg in Gegenwart von Salzsäure ca. 3 Minuten bei 60° reduziert wird, so resultiert nach

¹) Combes, *Compt. Rend.* **153**, 1911. p. 886; **157**, 1913. p. 1002, 1454
158, 1914. p. 272.

Abfiltrieren eine farblose oder blaßrote Lösung, die beim Erhitzen auf 100° sich tief rot färbt und bei längerem Erhitzen den Farbstoff fast quantitativ ausscheidet. Die Suspension gibt den Farbstoff an Amylalkohol quantitativ unter sofortiger Auflösung ab. Diese Lösung verhält sich gegen Soda usw. wie eine Anthocyanidinlösung. Wird ein nicht mit Amylalkohol ausgeschüttelter Extrakt mit Salzsäure erhitzt, so resultiert eine braunrote Fällung, die natürlich ein Gemenge des amyalkohollöslichen roten und des braunen Farbstoffs darstellt.

Es ergibt sich also, daß in den grünen Blättern von *Ampelopsis hederacea* eine Substanz vorhanden ist, die sich wie eine Anthocyanidinpseudobase verhält. Außerdem ist eine schon von Combes nachgewiesene, in saurer Lösung leicht gelbgefärbte Substanz vorhanden, die durch Reduktion in einen Farbstoff der Anthocyangruppe umgewandelt werden kann. Es erhebt sich noch die Frage, ob diese gelbe Substanz evtl. ein Glukosid darstellt; dafür spricht der Umstand, daß der mit Amylalkohol ausgewaschene Extrakt, der an Amylalkohol keine Spur des gelben Stoffes abgibt, nach Erhitzen mit Salzsäure den dabei entstehenden braunen Farbstoff fast quantitativ an Amylalkohol abgibt; der nicht in Amylalkohol gehende geringe Farbstoffrest ist evtl. durch Beimengung anderer Substanzen bedingt. Die Tatsache, daß der nach Reduktion entstehende rote Farbstoff quantitativ in Amylalkohol übergeht, spricht nicht gegen die Glukosidnatur seines Chromogens, da die Reduktion ziemlich kräftig geleitet werden muß und dabei möglicherweise eine Hydrolyse erfolgt.

Die vorliegenden Versuche wurden Mitte Juli ausgeführt. Ob im Laufe der Vegetationsperiode sich Verschiebungen dieser Verhältnisse bemerkbar machen, ist Aufgabe einer weiteren Untersuchung.

Eine weitere hierher gehörige Erscheinung hat Tswett¹ beschrieben. Er fand, daß Äpfelschnitzel (Haut und Fruchtfleisch), die einige Tage in einem Alkohol-Salzsäuregemisch liegen, tief roten Farbstoff geben; beim Erwärmen tritt die Farbe sofort auf und zwar geht sie über Gelb-Orange gelb nach Bräunlich-rot. Beim Erhitzen von Apfelstücken in 20proz. Salzsäure ohne Alko-

¹) Tswett, Biochem. Zeitschr. 58, 1914. p. 225.

holzusatz erhielt Tswett eine erst rötliche, dann bräunliche Flüssigkeit. Auf Zusatz von Formol geht die Färbung der alkoholischen Lösung langsamer vor sich, jedoch resultierte dann ohne gelben Übergang gleich eine violettrote Lösung. Die Eigenschaften des roten Farbstoffs sind anthocyanartig. Tswett vermutet, daß die Wirkung des Formaldehyds darauf zurückzuführen ist, daß die Oxydation gewisser Chromogene zu braunen Farbstoffen dadurch hintangehalten und so die reine Farbe einer durch das Erhitzen entstehenden Substanz zutage tritt; er läßt jedoch die Frage offen, da er mit anderen reduzierenden Mitteln z. B. Ameisensäure, Natriumsulfit, keinen Erfolg hatte.

Die Nachuntersuchung an sauren Extrakten aus Äpfeln ergab folgendes. Der farblose Extrakt wurde beim Erhitzen mit Salzsäure intensiv braunrot und gab dann an Amylalkohol tief braunroten Farbstoff ab, während die wäßrige Schicht braun gefärbt blieb. Auch hier läßt sich mit Hilfe einer vor dem Erhitzen vorgenommenen amyalkoholischen Ausschüttelung feststellen, daß diese braunrote Farbe eine Mischfarbe darstellt. Der farblose amyalkoholische Auszug aus frischen Extrakten gab beim Erhitzen mit Salzsäure sofort und ohne gelbe Übergangsfärbung ein blasses Violetrot, das sich im Lauf von 5 Minuten zu einem ziemlich intensiven reinen Violetrot verstärkte. Beim Stehenlassen der salzsauren amyalkoholischen Auszüge in Zimmertemperatur trat ebenfalls eine schwache Rotfärbung auf. Die mit Amylalkohol ausgewaschene wäßrige Schicht färbte sich beim Erhitzen mit Salzsäure tief braun.

Da auf diese Weise eine Trennung des roten Farbstoffs, bzw. seines Chromogens, von dem Chromogen des braunen Farbstoffs möglich war, ließ sich der Einfluß des Formaldehyds auf die Farbstoffbildung im einzelnen untersuchen. Der mit Amylalkohol sechsmal ausgewaschene frische Extrakt gab mit Salzsäure und etwas Formalin erhitzt in der Tat keine Braunfärbung wie ohne Formalinzusatz, sondern nur eine verschwindend geringe Rosafärbung, die wohl von Resten amyalkohollöslichen Chromogens herrührt und nach ca. 5—10 Minuten einer schwachen gelbbraunen Färbung und einer geringen Ausfällung hellbrauner Flocken Platz machte.

Es liegt demnach in diesem Resultat eine Bestätigung der

Vermutung von Tswett, daß das Formaldehyd bei der Entstehung des roten Farbstoffs nicht beteiligt ist, sondern die Oxydation von anderen Chromogenen zu braunen Farbstoffen hintanhält. Daß andere Reduktionsmittel versagen, mag daran liegen, daß diese zugleich auch das Chromogen des roten Farbstoffs oder diesen selbst alterieren.

Denn es zeigte sich, daß auch das Formaldehyd nicht ohne Einfluß auf den roten Farbstoff ist, eine Beobachtung, die gleichzeitig den Anlaß zu einer interessanten Feststellung an chemisch reinem Cyanidinchlorid gab.

Wird die amyalkoholische Ausschüttelung des frischen Äpfel-Extraktes mit Salzsäure und etwas Formol erhitzt, so färbt sich Lösung nur vorübergehend violett an, indem der Farbstoff rasch und quantitativ in rosavioletten Flocken ausfällt und der Amylalkohol wieder farblos wird. Diese Farbstoffmodifikation ist auch bei langem Erhitzen in Amylalkohol unlöslich, ebenso in kaltem und heißem Aethylalkohol und in Methylalkohol. Auch in 10proz. Sodalösung sind die Farbstoffflocken unlöslich, haben jedoch den Anthocyancharakter bewahrt, indem sie sich sofort blau färben; in Kalilauge färben sie sich grün und gehen teilweise grün in Lösung.

Da nun dieser aus Äpfeln gewonnene Farbstoff nach seinem ganzen Verhalten als ein Anthocyanidin betrachtet werden muß, war es von Wert, festzustellen, ob dieses Verhalten gegen Formaldehyd auch bei chemisch definierten Anthocyanidinen zu beobachten ist.

Reines Cyaninchlorid, das aus Blüten der Dahlienrasse »Night« nach der Vorschrift Willstätter's hergestellt worden war, wurde in 17proz. Salzsäure hydrolysiert und die entstandene Cyanidinchloridlösung mit einigen Tropfen Formol weiter bei 100° gehalten. Der Farbton vertiefte sich rasch und nach 2—3 Minuten begann eine Ausfällung violetter kleiner Flocken, die nach ca. 15 Minuten fast quantitativ war. Der abfiltrierte und mit Salzsäure gewaschene Niederschlag war sowohl in kaltem als in heißem Amylalkohol unlöslich, verhielt sich also wie der aus Äpfeln mit Formol dargestellte Farbstoff. Gegen Soda verhielt sich der Niederschlag verschieden je nach Zeitdauer der vorangegangenen Erhitzung mit Formol. Nach

10 Minuten Erhitzen lösten sich¹ die Flocken in Sodalösung vollständig mit tief blauer Farbe, nach halbstündigem Erhitzen nur noch teilweise; die ungelösten Flocken wurden ebenfalls dunkelblau; in KOH lösten sich die Flocken in beiden Fällen mit grüner Farbe. Eine ohne Formol erhitzte Kontrollportion schied natürlich das schwer lösliche Cyanidinchlorid aus, jedoch weit langsamer, außerdem ging der Niederschlag beim Ausschütteln mit Amylalkohol quantitativ unter Auflösung in diesen über. Derselbe Effekt mit Formol wurde erzielt, wenn eine amyloalkoholische Cyanidinchloridlösung über Salzsäure und Formol erhitzt wurde. Beim Erhitzen der salzsauren Cyanidinlösung ist ein Überschuß von Formol zu vermeiden, da schon geringer Überschuß die Ausfällung verhindert.

Worauf diese Veränderung des Cyanidins durch Formol beruht, ist Sache chemischer Untersuchung. Hier genügt die Feststellung, daß der aus Äpfeln *in vitro* erhältliche rote Farbstoff, sich sowohl in seinem Verhalten gegen Alkalien und Säuren, als auch in der Löslichkeit gegenüber Amylalkohol und ihrer eigentümlichen Alteration durch Formaldehyd wie ein Anthocyanidin verhält und das im Apfel vorhandene Chromogen offenbar als Anthocyanidinpseudobase anzusprechen ist.

Dasselbe Verhalten gegen Formaldehyd zeigten die amyloalkohollöslichen Chromogene bzw. Farbstoffesämtlicher in diesem Abschnitt besprochenen Pflanzen außer Weintrauben und Rose (vgl. folgendes), die nicht untersucht wurden, ferner der betreffende Farbstoff von *Polygonum compactum*.

Außer beim Apfel erhielt Tswett auf die oben beschriebene Weise anthocyanartige Farbstoffe aus andern Pflanzenorganen, z. B. den weißen Blütenblättern von Rosen und Cyclamen, ohne jedoch diese Stoffe näher untersucht zu haben.

Schon früher wurde erwähnt, daß Willstätter bei der Isolierung des Cyaninchlorids aus roten Rosen auf einen Farbstoff gestoßen ist, der sich in methyloalkoholisch-salzsauren Auszügen erst beim Stehenlassen bildete und der von ihm nicht als mit Cyaninchlorid identisch angesehen wird.

Eigene Untersuchungen an Rosenblüten konnten wegen vorgeschrittener Jahreszeit nicht mehr in umfangreicher Weise vor-

genommen werden. Es wurden zwei blaßrote Rosensorten untersucht. Die hellroten sauren Extrakte gaben einen farblosen amyalkoholischen Auszug, der mit Salzsäure erhitzt nur schwach gelbrot wurde. Wurden die Extrakte so lange mit Amylalkohol gewaschen (5 mal), bis im Amylalkohol kein Chromogen mehr nachzuweisen war, so wurden sie beim Erhitzen mit Salzsäure dunkelgelb und gaben an Amylalkohol braunstichig-dunkelroten Farbstoff ab und zwar in weit größerer Menge, als sie dem ursprünglich vorhandenen Anthocyan entsprechen konnte. Es scheint hier ein Farbumschlag beim Zusatz des Amylalkohols einzutreten, da die dunkelgelbe Farbe des erhitzten Extrakts keine Mischfarbe zwischen Rot und etwa Hellgelb sein konnte. Das Chromogen dieses Farbstoffs wäre demnach als die Pseudobase eines (amylalkoholunlöslichen) Anthocyanglukosids anzusprechen, das sich im Gegensatz zu den bekannten Anthocyanglukosiden schwieriger zum Farbstoff isomerisiert, eine Annahme die auch Willstätter betreffs des von ihm in der Rose angebroffenen zweiten Farbstoffs macht, ohne jedoch seine Glukosidnatur festgestellt zu haben. Eine Umwandlung des Chromogens durch Stehenlassen der Extrakte mit Salzsäure ist jedoch in den beiden beschriebenen Fällen und auch bei einer dunkelroten Rose nicht gelungen.

Chromogene, die Farbstoffe der Anthocyangruppe liefern, scheinen bei den Rosaceen sehr verbreitet zu sein. Peche¹ hat mikrochemisch in Schnitten von grünen Rosen-Laubblättern durch rasches Erhitzen mit 20 proz. Kalilauge und Formol grünen Farbstoff erhalten, der beim Ansäuern in Rot umschlägt, und erzielte dieselbe Wirkung, nur unsicherer, durch Erhitzen mit Salzsäure und Formol. Wie die Wirkung von KOH auf diese Chromogene mit derjenigen von Salzsäure zusammenhängt, muß noch untersucht werden. Jedenfalls sprechen eigene Versuche, die mit grünen Blättern von *Cydonia vulgaris* angestellt wurden, dafür, daß die mit Salzsäure entstehenden Farbstoffe bei den Rosaceen-Laubblättern den andern beschriebenen aus Chromogenen in vitro erhaltenen Farbstoffen analog sind.

Die sauren, gelb gefärbten Extrakte aus grünen Quittenblättern geben einen gelblichen amyalkoholischen Auszug, der

¹) Peche, Ber. bot. Ges. **31**, 1913. p. 462.

beim Erhitzen mit Salzsäure intensiv rot wird; beim Waschen mit Na-Acetat schlägt die Farbe in dunkelviolett um. Die mehrmals mit Amylalkohol gewaschene wäßrige Schicht wird beim Erhitzen mit Salzsäure intensiv gelb mit Trübung und gibt den gelben Stoff an Amylalkohol quantitativ unter vollkommener Auflösung ab. Wird die gelbe Lösung vor dem Erhitzen reduziert bei ca. 60°, so wird die farblos gewordene filtrierte Lösung beim Erhitzen hellrot und gibt den Farbstoff vollkommen an Amylalkohol mit rein roter Farbe ab.

Es liegt also auch hier wie bei Ampelopsis neben einer Anthocyanidinpseudobase ein Chromogen vor, das sich wie ein Anthocyanin verhält, indem es erst nach Erhitzen mit Säure an Amylalkohol (gelben) Farbstoff abgibt und als eine den Anthocyanen sehr nahe stehende Oxydationssstufe aufzufassen ist, da sie beim Reduzieren und nachherigen Erhitzen roten Farbstoff liefert. Ganz junge Quittenblätter enthalten nur sehr wenig Chromogen.

Es ist natürlich nicht möglich, eine exakte Beweisführung für die hier vorgetragene Auffassung von dem chemischen Charakter der untersuchten Chromogene und der aus ihnen entstehenden Farbstoffe zu erbringen, so lange nicht eine Konstitutionsermittlung dieser Stoffe selbst vorgenommen wird. Immerhin sind die auf qualitativem Wege feststellbaren Analogien dieser Stoffe mit den chemisch bekannten Anthocyanen so weitgehend, daß zwischen beiden zum mindesten vom physiologischen Gesichtspunkt aus ein inniger Zusammenhang bestehen muß.

Jedoch muß noch auf eine Farbstoffgruppe hingewiesen werden, die wenigstens in ihrem Entstehen eine gewisse Ähnlichkeit mit den in vitro darstellbaren anthocyanartigen Stoffen zeigt, die Gruppe der Gerbstoffe. Diese Stoffe entstehen aus einer Reihe von Gerbstoffen beim Erhitzen mit verdünnter Mineralsäure zumeist als rote Niederschläge, sind aber im Gegensatz zu den auf ähnliche Weise entstehenden anthocyanartigen Stoffen meist unlöslich in Alkohol und haben gegenüber Soda-lösung, soweit sie darin überhaupt löslich sind, keinen Indikator-

charakter. Einen interessanten Ausnahmefall hat jedoch Rochleder¹ beschrieben.

Er erhitzte Roßkastaniengerbstoff in verdünnter Salzsäure; die Lösung färbte sich dunkelrot unter Abscheidung roter Flocken, die sich beim Abkühlen noch vermehren. Hierbei erhielt Rochleder zwei »Modifikationen« des roten Farbstoffs, eine alkohol-lösliche und eine alkoholunlösliche, wobei die lösliche Form überwog. Die alkohollösliche Form löste sich in Soda mit violetter Farbe; auf Zusatz von Salzsäure fiel die Substanz in hellroten Flocken wieder aus; Kalilauge löste mit smaragdgrüner Farbe. Die alkoholunlösliche Modifikation war in Soda und kalter Kalilauge unlöslich.

Diese Angaben waren die Veranlassung, Roßkastanienfrüchte mit der in dieser Arbeit angewandten Methode zu untersuchen. Grüne Kapselwände fast reifer Früchte lieferten mit 5 proz. Schwefelsäure zerrieben einen gelblichen Extrakt, der an Amylalkohol genau wie in den vorher beschriebenen Fällen ein Chromogen abgab, das beim Erhitzen mit Salzsäure sich in 3 Minuten in einen intensiv roten Farbstoff umwandelte. Mit Na-Acetat ausgeschüttelt wurde die amylnalkoholische Lösung violettrot, ohne an die Acetatlösung Farbstoff abzugeben; in Sodalösung ging der Stoff mit blauvioletter, oft auch tief blauer Farbe quantitativ über; wurde die vom Amylalkohol abgeschiedene alkalische Schicht mit Salzsäure angesäuert, so wurde die Lösung wieder rot und setzte nach einigen Stunden rote Flocken ab. Wurde die neutralisierte amylnalkoholische Lösung mit Amylalkohol verdünnt und einige Stunden stehen gelassen, so wurde die Lösung mißfarben und beim Erhitzen mit Salzsäure wieder rot. Auch die oben beschriebene Formaldehydreaktion gelang auf dieselbe Weise wie bei reinem Cyanidinchlorid usw. Der fünfmal mit Amylalkohol gewaschene wäßrige Extrakt wurde beim Erhitzen mit Salzsäure gelbbraun mit Trübung und gab den Farbstoff quantitativ an Amylalkohol ab. Eine Reduktion dieses Stoffes zu rotem Farbstoff vor der Erhitzung ist nicht gelungen.

Ebenso wie die Kapselwände verhielten sich auch die Schalen der noch nicht braun verfärbten Samen.

¹) Rochleder, Sitzgs.-Ber. k. Akad. d. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., 54, II. Abt. 1866. p. 607.

Es liegen also auch hier dieselben Verhältnisse vor wie in den vorher beschriebenen Fällen, ein Chromogen, das sich wie eine Anthocyanidinpseudobase verhält und ein Farbstoff, der sich in seiner Löslichkeit gegenüber Amylalkohol, gegen Alkalien und in der Isomerisationsfähigkeit wie ein Anthocyanidin verhält.

Diese Befunde leiten angesichts der Untersuchung von Rochleder zu der schon oft diskutierten Frage über, ob die Anthocyane aus Gerbstoffen entstehen. So oft diese Abstammung schon behauptet wurde (u. a. von Wigand¹, Pick²), so wenig ist sie bewiesen, da die chemische Konstitution der Gerbstoffe bis heute noch nicht, diejenige der Anthocyane erst neuerdings erschlossen worden ist. Einen Fortschritt in dieser Frage stellen die obenerwähnten Untersuchungen von Peche insofern dar, als der Verf. mikroskopisch feststellte, daß zur Bildung der anthocyanartigen Stoffe auf künstlichem Wege nur die eisengrünenden Gerbstoffe befähigt sind. Nun ist aber die Grünfärbung mit FeCl_3 nicht nur ein Merkmal einer Gerbstoffgruppe, sondern auch einer Reihe von Flavonderivaten, d. h. von den Substanzen, die bewiesenermaßen Anthocyane liefern können, so daß also die Feststellung Peche's im Gegenteil imstande ist, die Gerbstofftheorie zu entkräften. So ist auch der Befund Rochleder's am Roßkastaniengerbstoff, der übrigens von Rochleder nicht in Beziehung zur Anthocyanbildung gebracht wurde, kein Beweis für diese Theorie; denn bei dem Reichtum der Roßkastanie an Flavonderivaten wie Quercitrin u. a. kann sein Ausgangsmaterial an Gerbstoff leicht flavonartige Substanzen bzw. ihre Reduktionsprodukte mit enthalten haben.

Trotzdem ist nicht zu verkennen, daß die Anthocyane und Flavone mit den Gerbstoffen insofern Ähnlichkeit besitzen, als sie bei der Kalischmelze z. T. dieselben Stoffe liefern, Phloroglucin, Protokatechusäure u. a., eine Tatsache, die auch Dekker³ bezüglich der Verwandtschaft der gelben Pflanzenfarbstoffe mit den Gerbstoffen betont. Freilich gibt die Kali-

¹) Wigand, Bot. Ztg. 20, 1862. p. 121.

²) Pick, Bot. Centralbl. 15, 1883. p. 281, 314, 343.

³) Dekker, Die Gerbstoffe. Berlin. 1913. p. 378.

schmelze keinen Aufschluß über das etwaige Vorhandensein des Pyronkerns oder des Pyryliums in Gerbstoffen, d. h. eben der für Flavone bzw. Anthocyane typischen Komplexe; denn diese werden in der Kalischmelze zerstört. Jedenfalls würde sich die Frage der Entstehung der Anthocyane aus Gerbstoffen zurückführen auf die Frage der Entstehung der Flavone aus Gerbstoffen, seit Willstätter aus Quercetin durch Reduktion ein Anthocyan erhalten hat und in der Pflanze selbst gleichsinnige Prozesse (vom Verfasser bei *Polygonum compactum* und postmortal bei *Paeonia*) nachgewiesen werden konnten.

Zu einer anderen Betrachtungsweise führt die Berücksichtigung einiger physiologischer Tatsachen. Overton¹ fand, daß Zuckerdarreichung eine Anthocyanbildung zur Folge haben kann, Büsgen² fand dasselbe für die Gerbstoffbildung (nachgewiesen mit Hilfe des relativ zuverlässigen Kaliumbichromats als Reagens). Demnach könnten die Flavon-Anthocyan- und die Gerbstoffbildung als parallel verlaufende Prozesse aufgefaßt werden, die miteinander nichts gemein haben als die Bausteine, nämlich die aus Zucker entstehenden hydroxylierten aromatischen Verbindungen.

Zusammenfassung.

Die Arbeiten Willstätter's über die Chemie der Anthocyane liefern ein wertvolles Material für die Untersuchung des Anthocyanstoffwechsels mit Hilfe qualitativ chemischer Methoden. Unter diesem Gesichtspunkt sind besonders ff. Eigenschaften der Anthocyane hervorzuheben: Unlöslichkeit der Farbstoffglukoside (Anthocyanine) in Amylalkohol, soweit sie rhamnosefreie Diglukoside darstellen, Löslichkeit der zuckerfreien Farbstoffe (Anthocyanidine) in Amylalkohol; Isomerisierbarkeit zu farblosen Pseudobasen, die bei den Anthocyaninen sehr leicht, bei den Anthocyanidinen schwieriger vor sich geht, wie auch der umgekehrte Prozeß mit derselben Verschiedenheit verläuft; ferner Entstehung von Anthocyan aus Flavonol auf dem Weg der Reduktion.

¹) Overton, l. c.

²) Büsgen, Jen. Zeitschr. f. Natwiss. 24, N. F. 17. 1889.

Untersuchungen an *Polygonum compactum* Hook.

In jungen roten wie in ausgewachsenen grünen Blättern findet sich im Frühjahr ein Chromogen, das sich wie eine Anthocyanidinpseudobase verhält. — In lebenden Pflanzen war Anthocyanidin bis jetzt nur in einigen Traubensorten von Willstätter aufgefunden worden. — In *Polygonum* kommt das Anthocyanidin nicht als Farbstoff, das Anthocyanin nicht als Pseudobase vor. Ferner ist in dieser Pflanze eine gelbe Oxydationsstufe des Anthocyanidins vorhanden.

Die Mengen des Anthocyanidins und seiner Oxydationsstufe sind wechselnd und stehen zueinander in reziprokem Verhältnis. Diese Schwankungen sind in erster Linie vom Licht abhängig, derart, daß offenbar durch photochemische und daher von der Temperatur unabhängige Reduktion aus der Oxydationsstufe der Farbstoff als Pseudobase gebildet wird, während im Dunkeln eine durch Wärmezufuhr beschleunigte Rückoxydation des Anthocyanidins zur Oxydationsstufe stattfindet. Hierbei macht sich der Einfluß von Licht und Dunkel schon in wenigen Stunden bemerkbar.

Es läßt sich also bei *Polygonum compactum* der bei der Anthocyanbildung schon oft konstatierte gegensinnige Einfluß von Licht und Wärme, wenigstens am zuckerfreien Farbstoff, in chemisch definierbare Prozesse zerlegen. Außerdem kann hier die *in vitro* schon öfters konstatierte und von Willstätter exakt bewiesene Entstehung von Anthocyanfarbstoffen durch Reduktion in der lebenden Pflanze nachgewiesen werden.

Im Sommer ist in den Blättern ein von dem Anthocyanidin des Frühljahrs leicht verschiedenes Anthocyanidin als Pseudobase nachweisbar, das in seiner Menge von Licht- und Temperatureinflüssen unabhängig ist.

Die bei der Entrötung der jungen Blätter sich abspielenden chemischen Vorgänge lassen sich mit Hilfe folgender Resultate erhellen:

In den roten (und auch in den grünen) Blättern ist ein Enzym vorhanden, das aus dem Anthocyanin das Anthocyanidin

abspaltet, wie sich bei der Autolyse unter Sauerstoffabschluß nachweisen läßt. Somit beruht das Verschwinden des Anthocyans im Frühjahr vermutlich auf einer fermentativen Hydrolyse des Anthocyanins und der Umwandlung des abgespaltenen Anthocyanidins in die farblose Pseudobase, die dann wohl den oben geschilderten Einflüssen von Licht und Temperatur ausgesetzt ist.

Jedoch ist die Anthocyaninhydrolyse nicht die einzige Ursache des Auftretens von Anthocyanidin und seiner Oxydationsstufe, da diese beiden Stoffe auch schon in ganz jungen Blättern vorhanden sind.

Autolyse bei Luftzutritt liefert Oxydationsprodukte der Farbstoffe, die nach nicht zu langer Sauerstoffeinwirkung teilweise zu Farbstoff reduziert werden können.

In den Frühjahrsblättern wurden noch zwei weitere Chromogene nachgewiesen, die beide dem Anthocyanin nahe zu stehen scheinen. Das eine liefert vermutlich durch Isomerisation roten, das andere durch Oxydation braunen Farbstoff.

Untersuchungen an verschiedenen Paeoniapflanzen.

In den vegetativen Organen verschiedener Paeonien wurde die Oxydationsstufe eines Anthocyanidins, jedoch kein Anthocyanidin selbst nachgewiesen. Das Auftreten dieses Stoffes geht unabhängig von Lichtverhältnissen im allgemeinen mit dem Vorkommen von Anthocyanin in der betreffenden Pflanze parallel. Dagegen kann in den Blüten neben der Oxydationsstufe auch Anthocyanidinpseudobase vorhanden sein, jedoch nur in geringen Mengen, die zur Anthocyaninbildung bei der Blütenentwicklung nicht in Beziehung stehen. In den gelben Blüten von *Paeonia Wittmanniana* stellt jedoch eine Anthocyanidin-Oxydationsstufe das färberische Prinzip der Blüte dar.

In jungen vegetativen roten und in herbstlichen Organen ist in großer Menge ein Chromogen vorhanden, das auf dem Weg postmortaler Reduktion und wohl gleichzeitig der Hydrolyse violetten oder roten Farbstoff der Anthocyangruppe liefert. In lebenden, in Stickstoffatmosphäre gehaltenen Blättern wird das Chromogen nicht in nachweisbarer Menge reduziert.

Untersuchungen über die Isomerisation der Anthocyanine.

Auch das Anthocyanin kann in der lebenden Pflanze als Pseudobase vorkommen, z. B. in Cobaeablüten; jedoch ist hier die Pseudobase in Anbetracht ihrer geringen Menge nicht als physiologische Vorstufe der Hauptmenge des später entstehenden Blütenfarbstoffs aufzufassen.

Untersuchungen an Chromogenen, die von anderen Autoren mit der Anthocyanbildung in Beziehung gebracht worden sind.

Die Befunde von Laborde, Combes usw. lassen sich unter Anwendung der auf der Chemie der Anthocyane begründeten Untersuchungsmethoden unter einheitliche Gesichtspunkte bringen und ergänzen. In Weintraubenbeeren, Ampelopsisblättern, Äpfeln, Cydoniablättern u. a. finden sich ebenfalls Chromogene, die sich wie eine Anthocyanidinpseudobase verhalten. In Ampelopsis und Cydonia findet sich außerdem eine vermutlich glukosidische Oxydationsstufe eines Anthocyanins.

Zur Chemie der Anthocyane.

Anthocyanidin zeigt gegenüber Formaldehyd ein bisher unbekanntes Verhalten, indem es mit Salzsäure und wenig Formaldehyd erhitzt, die für Anthocyanidin typische Löslichkeit in Amylalkohol verliert. Diese Reaktion wurde bis jetzt mit reinem Cyanidinchlorid und mit dem künstlich aus Äpfeln, Cydonia-, Ampelopsisblättern usw. gewonnenen Farbstoff angestellt und liefert einen weiteren Beweis für die Zusammengehörigkeit der hier untersuchten Farbstoffe mit den exakt chemisch definierten Anthocyanen.

Straßburg i. E., September 1918.



ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Botanik](#)

Jahr/Year: 1918

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Noack Kurt

Artikel/Article: [Untersuchungen über den Anthocyanstoffwechsel auf Grund der chemischen Eigenschaften der Anthocyangruppe. 561-628](#)