

Physiologische Untersuchungen an Flavonolen und Anthocyanen.

Von
Kurt Noack.

LIBRARY
NEW YORK
BOTANICAL
GARDEN

I. Einleitung.

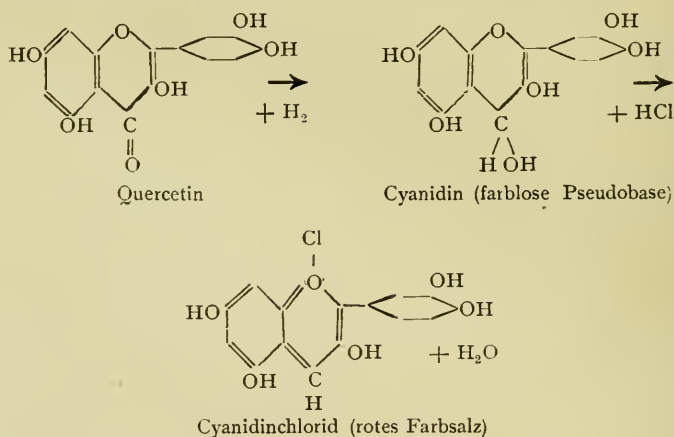
Aus dem Vorkommen der Anthocyane in den verschiedensten Teilen der Pflanze ergibt sich von selbst die Folgerung, daß die Funktion dieser Farbstoffe nicht von einem einzigen Gesichtspunkt aus betrachtet werden kann. Offensichtlich ist, daß den Anthocyanen auf Grund ihres Farbstoffcharakters in vielen Organen die Rolle der Sichtbarkeitserhöhung zukommt, ein Fall, der bei Blüten, Früchten, extrafloralen Schauapparaten u. a., realisiert ist. Es ist dagegen bis jetzt nicht gelungen, einen leitenden Gedanken herauszuarbeiten, der die Rolle der Anthocyane in den vegetativen Teilen der Pflanze verständlich machen würde. Die verschiedenen Ansichten über die Funktion der Anthocyane in Blättern usw. wurden fast durchweg zu einer Zeit aufgestellt, in der die chemische Konstitution der Anthocyane noch nicht bekannt war und vor allem auch nicht die engen und physiologisch einfachen Beziehungen aufgedeckt waren, die zwischen den Anthocyanen und den im Pflanzenreich weit verbreiteten Flavonolen bestehen. Infolgedessen mußte bis dahin eine an sich naheliegende Betrachtungsweise ganz vernachlässigt werden, nämlich den Anthocyanen auf Grund ihrer konstitutionellen Eigenschaften und ihrer chemischen Wandlungsfähigkeit eine Rolle in irgendwelchen Stoffwechselvorgängen zuzuschreiben, wobei freilich der Farbstoffcharakter erst in zweiter Linie in Betracht kommen kann.

Im folgenden sollen einige Befunde mitgeteilt werden, die die Berechtigung einer solchen Anschauungsweise darlegen;

außerdem sollen noch einige andere, den Anthocyanstoffwechsel betreffende Fragen an der Hand von Versuchsergebnissen erörtert werden.

II. Chemische und physiologische Grundlagen.

A. Die Anthocyane sind Derivate des β -Phenyl-Benzo- γ -Pyryliums und gewöhnlich in der Pflanze als Mono- oder Diglukoside (Anthocyanine) enthalten¹, während die Aglukone, d. h. die zuckerfreien Komponenten (Anthocyanidine), wenigstens in der Form als Farbstoff, seltener angetroffen werden. Die Anthocyanidine stellen die Reduktionsstufe eines entsprechenden Flavonols dar, z. B.:



Dieselbe Beziehung besteht z. B. zwischen Myricetin und Delphinidin oder Kämpferol und Pelargonidin. Die Reduktion des Quercetins zu Cyanidin ist von Willstätter ausgeführt worden.

Die Anthocyanfarbstoffe isomerisieren sich in neutraler Lösung zu farblosen Pseudobasen, aus denen auf Säurezusatz das Farbsalz zurückgebildet wird. Zwischen Anthocyaninen und Anthocyanidinen besteht nun der wichtige Unterschied, daß bei den Glukosidverbindungen diese beiden gegenläufigen Pro-

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

zesse sich schon in der Kälte rasch abspielen, während bei den Aglukonen hierzu Erhitzen oder längeres Stehenlassen nötig ist. Die Pseudobasen kommen ebenfalls in der Pflanze vor und zwar weit häufiger in der zuckerfreien als in der glukosidischen Form (näheres hierüber siehe Noack¹).

Die Flavonole treten in der Pflanze teils als Aglukon, teils als Glukosid auf.

Anthocyane und Flavonole können verschiedene Zuckerarten in einem Molekül enthalten, wobei meist Glukose, Galaktose und Rhamnose in Betracht kommt. In Gegenwart von Rhamnose scheinen nicht immer einfache, molare Verhältnisse zwischen diesem Zucker und der etwa gleichzeitig vorhandenen Hexose vorzuliegen (vgl. Willstätter und Zollinger²).

B. Verf. hat a. a. O. nachgewiesen, daß Flavonole bei der Autolyse von Pflanzenorganen (*Paeonia*), wie auch in der lebenden Pflanze (*Polygonum compactum*) zu Anthocyanen hydriert werden können; im letzteren Fall zeigte sich, daß im Licht die Hydrierung eines Flavonols zu einer Anthocyanidinpseudobase vor sich geht und im Dunkeln der gegenläufige Prozeß sich abspielt.

III. Das Vorkommen von Anthocyanen und Flavonolen gleichen Glukosidcharakters in einer und derselben Pflanze.

1. Vorbemerkung.

Eine Reihe von Fällen zeigt, daß in der Pflanze Stoffe gepaart sein können, die sich voneinander nur in der Oxydationsstufe unterscheiden. Hierher gehören u. a.: das Chlorophyll a und Chlorophyll b ($a = \text{MgN}_4\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5$, $b = \text{MgN}_4\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_6$), das Carotin und Xanthophyll ($\text{Car.} = \text{C}_{40}\text{H}_{56}$, $\text{X} = \text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$), ferner die Atmungschromogene mit den zugehörigen Pigmenten. Beim Chlorophyll und Carotin ist nicht erwiesen, ob eine ständige Umwandlung der beiden Oxydationsstufen ineinander in der lebenden Zelle vor sich geht und ob bejahendenfalls dieser Vorgang für die Funktion der betreffenden Stoffe von Belang ist; Willstätter und Stoll³ lehnen eine solche Möglichkeit

¹ Noack, Kurt. Zeitschr. f. Bot. 1918. 10, 561.

² Willstätter und Zollinger. Liebigs Ann. 1916. 412, 166.

³ Willstätter und Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin. 1918. S. 3 ff.

ab auf Grund der Tatsache, daß das Verhältnis der beiden Chlorophyllfarbstoffe nicht, das der Carotinoide im allgemeinen nicht erheblich verändert werden kann. Damit ist jedoch die Frage noch nicht erledigt, indem das konstante Verhältnis der beiden zusammengehörigen Komponenten auch das Resultat einer Gleichgewichtseinstellung der Oxydations- und Reduktionsprozesse sein könnte. Eine solche Gleichgewichtseinstellung ist bei dem dritten der erwähnten Stoffpaare, den Atmungspigmenten bzw. »Chromogenen«, gegeben, deren Funktion im Atmungsstoffwechsel nach Palladin¹ und Heinr. Wieland² mit Sicherheit in der Wandlung ihrer Oxydationsstufe zu erblicken ist; hierbei ist das Gleichgewicht in der lebenden Pflanze fast vollständig nach der Seite der hydrierten Stufe verschoben.

Wenn nun berücksichtigt wird, daß auch der Assimilationsprozeß letzten Endes einen Wandel der Oxydationsstufe darstellt, so ist doch die Frage aufzuwerfen, ob nicht Stoffe leicht veränderlicher Oxydationsstufe in Form einer Reaktionskopplung hierbei ähnlich wie bei der Atmung beteiligt sind derart, daß bei Sistierung der Assimilation eine Verschiebung des Gleichgewichts stattfindet, so wie es nach dem Aufhören der Atmung bei den Atmungschromogenen zugunsten einer Anreicherung an Atmungspigment der Fall sein kann.

Im folgenden sucht der Verfasser zu zeigen, daß die Anthocyane und ihre dehydrierte Stufe, die Flavonole, in der angegebenen Weise bei der Assimilation beteiligt sein können. Den Ausgangspunkt der Überlegungen bildete die herbstliche Anthocyanbildung in Blättern, die ja zeitlich mit dem Aufhören der Assimilation zusammenfällt und in Anbetracht des Flavonolreichtums solcher Blätter zum Schlusse führen kann, daß dem System Flavonol – Anthocyan in der Assimilation die oben charakterisierte Rolle zufällt. Jedoch ist dabei eine Bedingung zu stellen, die sich aus den bis jetzt über das Flavonolvorkommen bekannten Tatsachen nicht hinreichend erschen läßt: es muß in einem und demselben Organ, wenn auch in verschiedenen Zeiten der Entwicklung, ein Flavonol und ein Anthocyan vor-

¹) Palladin. Biochem. Zeitschr. 1914. 60, 170.

²) Wieland, Heinr. Ber. chem. Ges. 1912. 45; I, 679, II, 2606; 1913 46, III, 3327.

handen sein, die sich nur in ihrer Oxydationsstufe unterscheiden, also den gleichen Glukosidcharakter tragen und prinzipiell gleiche Konstitution ihres Aglukons besitzen; außerdem muß in den rein grünen Organen dieses Flavonol jederzeit vorhanden sein.

Bekanntlich wird in der Pflanze oft eine Mehrheit von Flavonolen angetroffen, die durch die Verschiedenheit sowohl des Glukosidcharakters als auch der Konstitution des Aglukons bedingt ist. So ist häufig in der Pflanze ein Quercetinglukosid mit Quercetin als Aglukon vergesellschaftet; ferner fand z. B. Perkin¹ in den Blüten von *Gossypium herbaceum* drei Flavonolglukoside verschiedenen Aglukoncharakters mit je einem Molekül Dextrose: Quercimeritrin, Gossypitrin, Isoquercitrin. Ähnlich fand Willstätter allenthalben verschiedene Anthocyanine in einem und demselben Organ.

Angesichts dieser Mannigfaltigkeit, die eine Analogie in der Vergesellschaftung mehrerer nahe verwandter Alkaloide in einem und demselben Organ findet, ist es natürlich schwierig, das Vorkommen eines zusammengehörigen Flavonol-Anthocyanpaares in der Pflanze nachzuweisen. Wie verwickelt die Erscheinungen sind, mag daraus hervorgehen, daß Willstätter und Mallison² in den Blüten der tiefgelben Varietät des Stiefmütterchens Rutin (Quercetinrhamnoglukosid) antrafen, während Willstätter und Weil³ in der braun blühenden Varietät derselben Gattung ein Violanin benanntes Anthocyanidinrhamnoglukosid fanden, das als Aglukon Delphinidin enthält und somit nicht die Reduktionsstufe des Quercetins darstellt, sondern im Aglukon die Konstitution eines andern Flavonols, des Myricetins, besitzt. Nun hat gerade an diesem Fall Everest⁴ wahrscheinlich machen können, daß zwischen Anthocyan und Flavonol innerhalb einer und derselben Blüte genetische Beziehungen bestehen; er untersuchte die purpurschwarze Varietät des Stiefmütterchens und fand wie Willstätter und Weil ein Delphinidin enthaltendes Anthocyanin neben dem zugehörigen

¹) Perkin, A. G. Journ. chem. Soc. 1909. 95, II, 2181.

²) Willstätter und Mallison. Liebigs Annal. 1915. 408, 158.

³) Willstätter und Weil. Ebenda. 1916. 412, 182.

⁴) Everest. Proc. Roy. Soc. 1918. Ser. B. 90, 231; Referat: Chem. Centralbl. 1918, II, 89, 961.

Myricetin, das er wenigstens durch Farbreaktionen mit Wahrscheinlichkeit identifizieren konnte.

Um nun auf diese Weise einen allgemeinen Einblick in den genetischen Zusammenhang zwischen Anthocyanen und Flavonolen in den einzelnen Pflanzen zu erhalten, ist es natürlich nötig, Übereinstimmung sowohl in der Aglukonkonstitution wie auch im Glukosidcharakter nachzuweisen. Die von Combes¹, Everest², dem Verf.³ u. a. erzielten Ergebnisse bei der Hydrierung von Flavonolen in Pflanzenextrakten sind für diese Frage nicht verwendbar, da die genannten Punkte hierbei nicht näher berücksichtigt wurden. Der eine Teil der Aufgabe, die Identifizierung der Aglukone, kann nur auf präparativem Wege befriedigend gelöst werden und setzt, abgesehen von andern Schwierigkeiten, beträchtliche Mengen an Untersuchungsmaterial voraus, zumal hier, wo es sich um die im Vergleich zu den Blüten relativ farbstoffarmen vegetativen Organe handelt; dasselbe gilt von der Identifizierung der einzelnen Zuckerarten. Leichter ist dagegen die Glukosidstufe der Anthocyane und, wie aus folgendem hervorgeht, auch der Flavonole in allgemeinen Zügen zu bestimmen, so daß sich der Verf. auf diesen zweiten Punkt beschränkte. Es ist damit freilich die gestellte Hauptaufgabe, die genetischen Beziehungen zwischen Anthocyanen und Flavonolen innerhalb derselben Pflanze festzustellen, nur zum Teil in Angriff genommen; immerhin ist damit eine Unterlage für weitere Untersuchungen geschaffen worden.

Die Aufgabe präzisiert sich also dahin, in vegetativen Organen mit der Fähigkeit der Anthocyanbildung ein Flavonol aufzufinden, das seiner Glukosidstufe nach mit dem von der Pflanze gebildeten Anthocyanin übereinstimmt, wobei natürlich sämtliche in dem betreffenden Organ greifbaren Flavonole berücksichtigt werden mußten. Zur Unterscheidung der verschiedenen Glukosidstufen wurde eine Methode mit herangezogen, die bis jetzt nicht bekannt ist und auf eine einfache Weise die Unterscheidung zwischen Glukosid und Aglukon erlaubt.

¹) Combes. Compt. Rend. Acad. Sc. Paris. 1911. 153, 886. 1913. 157, 1002, 1454. 1914. 158, 272.

²) Everest. Proc. Roy. Soc. 1914. 87, 444.

³) Noack, Kurt. l. c.

2. Die Unterscheidung zwischen glukosidischem und zuckerfreiem Flavonol mittels Hydrierung zu Anthocyanfarbstoffen.

Willstätter hydrierte Quercetin, ein Aglukon, in salzsaurer-alkoholischer Lösung mittels Na-Amalgam oder Mg in Gegenwart von Quecksilber und erhielt dabei sofort das rote Cyanidinfarbsalz. Der Verf. hat a. a. O. nachgewiesen, daß die Hydrierung von Flavonolen auch in amylalkoholischer Lösung mittels Zn, Mg und HCl in der Kälte ausgeführt werden kann; bei der Untersuchung der verschiedenen Pflanzenextrakte zeigte sich jedoch häufig, daß die ursprünglich gelbe Lösung während der Hydrierung nur farblos wurde und erst beim Erhitzen in Gegenwart von HCl sich rötete. Hieraus war gemäß der S. 2 angeführten Gleichung zu folgern, daß in diesem Fall die theoretisch zu fordernde Zwischenstufe der farblosen Anthocyanpseudobase in greifbarer Menge entsteht und die Wirkung der Erhitzung in der Isomerisierung zum Farbsalz besteht. Da nun diese Erscheinung nicht regelmäßig auftrat, sondern sich in vielen Fällen schon während der in der Kälte vorgenommenen Hydrierung eine schöne Rotfärbung einstellte, wurde das Verhalten chemisch reiner Flavonole auf diesen Punkt hin näher untersucht. Als Ausgangspunkt diente die Tatsache, daß die Pseudobasen der Anthocyanidine, d. h. der zuckerfreien Verbindungen, sich erst beim Erhitzen in saurer Lösung in das rote Farbsalz umwandeln, während die (glukosidischen) Anthocyanine schon in der Kälte beim Ansäuern aus der Pseudobase in das Farbsalz übergehen (vgl. S. 2f.). Eine Einschränkung besteht insofern, als die Anthocyanidinpseudobasen, wenn sie in konzentrierter Lösung gegeben sind, sich ebenfalls schon in der Kälte auf Säurezusatz rasch in das Farbsalz umwandeln.

Untersucht wurden zwei Flavonole, die sich nur im Glukosidcharakter voneinander unterscheiden: Quercitrin (= Quercetin-rhamnosid) und Quercetin (Aglukon).

Wird eine amylalkoholische Lösung von Quercitrin beliebiger Konzentration mit Zn und 15proz. Salzsäure bei Zimmertemperatur behandelt, so tritt innerhalb 5 Minuten eine schöne Rotfärbung auf; beim Erhitzen der abfiltrierten amylalkoholischen Schicht im kochenden Wasserbad tritt keine wesentliche Vertiefung des Farbtons auf. Wird dagegen eine verdünnte amyl-

alkoholische Lösung von Quercetin ebenso hydriert, so ist während der Hydrierung, auch wenn sie stundenlang ausgedehnt wird, keine Rötung, sondern nur ein Abblässen der gelben Farbe wahrzunehmen; erst beim Erhitzen der abfiltrierten amyalkoholischen Schicht in Gegenwart von Salzsäure tritt in wenigen Minuten eine intensive Rotfärbung auf. Dasselbe ist der Fall, wenn eine Quercitrinlösung vor der Hydrierung mit 10proz. Schwefelsäure bei 100° hydriert wird.

Die Erklärung dieses Unterschieds ergibt sich ohne weiteres aus dem oben Gesagten: in beiden Fällen entstehen bei der Hydrierung die farblosen Farbstoffpseudobasen, von denen jedoch die glukosidische in der sauren Lösung weit unbeständiger ist als die zuckerfreie und sich sofort in das Farbsalz umwandelt.

Wie schon bemerkt, geht die Isomerisierung der zuckerfreien Pseudobase in konzentrierter Lösung rascher vor sich als in verdünnter; auch diese Erscheinung läßt sich bei der Quercetinhydrierung feststellen. Es wurden zwei amyalkoholische Lösungen mit 0,5 % bzw. 0,05 % Quercetin hergestellt; die stärker konzentrierte wurde bei der Hydrierung sofort rot und vertiefte nach 5 Minuten filtriert und erhitzt ihren Farbton nach Dunkelrot, während die schwächere Lösung während der Hydrierung farblos blieb und erst beim Erhitzen schön rot wurde.

Der sowohl bei der Quercitrin- als bei der Quercetinhydrierung erhaltene rote Farbstoff war in Gegenwart schwacher Säure, z. B. 1/2proz. HCl, auch beim Erhitzen durchaus beständig und stellt daher Cyanidin bzw. Cyanidinrhamnosid dar, und nicht das in verdünnter Säure unbeständige Allocyanidin, das Willstätter ausschließlich oder als Hauptprodukt neben Cyanidin bei der Quercetinhydrierung erhalten hat und das offenbar eine weitere Hydrierungsstufe des Quercetins unter Sprengung des Pyronrings darstellt. Wenn im vorliegenden Fall die Flavonolhydrierung schonender verlief als bei der Versuchsanordnung Willstätters, so ist dies wohl einer Bremswirkung des als Lösungsmittel verwandten Amylalkohols zuzuschreiben.

Beachtenswert ist, daß bei der Hydrierung des Quercitrins sehr rasch eine Zuckerabspaltung einsetzt, die aber erst nach der Reduktion erfolgen kann, wie die Raschheit der Isomeri-

sierung zum roten Farbsalz zeigt. Wofern nämlich die Hydrierung nicht nach wenigen Minuten unterbrochen wird, ist das im Amylalkohol enthaltene Reduktionsprodukt zwischen diesem und verdünnter Säure nicht verteilbar, wie es allgemein bei Anthocyanmonoglukosiden und rhamnosehaltigen Diglukosiden der Fall ist; nur bei rascher Unterbrechung der Hydrierung kann eine solche Verteilungsfähigkeit festgestellt werden. Für die Zuckerabspaltung bei etwas längerer Hydrierung spricht auch der Umstand, daß die mit Na-Azetat gewaschene, neutrale amyalkoholische Lösung sich nur langsam entfärbt und die so entstandene Pseudobase nicht sofort bei Säurezusatz, sondern erst bei darauffolgendem Erhitzen ins Farbsalz überging. Diese reduktive Spaltung des Quercitrins wurde schon von Everest (a. a. O.) festgestellt, jedoch von Willstätter¹ bestritten. Sie ist auch bei andern Flavonolglukosiden in mehr oder minder ausgeprägter Weise vorhanden, z. B. beim Rutin (Quercetin-rhamnoglukosid); wird dieses in amyalkoholischer Lösung 5 Minuten hydriert, so läßt sich der entstandene rote Farbstoff mit 1proz. Schwefelsäure fast vollständig dem Amylalkohol entziehen, während nach zweistündiger Hydrierung der größte Teil des Farbstoffs nicht mehr auf diese Weise dem Amylalkohol entzogen werden kann. Auch chemisch reines Cyanidindiglukosid (Cyanin), das in Gegenwart von HCl etwas in Amylalkohol löslich ist und in dieser Lösung hydriert wird, erfährt hierbei eine Spaltung.

In der im vorigen beschriebenen Hydrierungsmethode ist nun ein Hilfsmittel gegeben, um auch in Pflanzenextrakten den Glukosidcharakter eines darin enthaltenen Flavonols zu bestimmen; denn es zeigte sich, wie späterhin noch näher auszuführen sein wird, daß aus sauren Pflanzenextrakten nicht nur die zuckerfreien Flavonole, sondern auch eine bestimmte Gruppe der Flavonolglukoside mit Amylalkohol ausgeschüttelt werden können. Es ist aus dem S. 7 angeführten Grunde nur darauf zu achten, daß im Falle sofortiger Rotfärbung bei der Hydrierung die amyalkoholische Lösung nicht zu konzentriert ist; d. h. es muß in diesen Fällen die Hydrierung des fraglichen Flavonols in verschiedenen Verdünnungen vorgenommen werden.

¹) Willstätter und Mallison. Sitzgsber. pr. Ak. d. Wiss. Berlin. 1914. 29, 772.

3. Die Unterscheidung zwischen Gruppen verschiedenen Glukosidcharakters innerhalb der glukosidischen Flavonole.

Die Anthocyanfarbstoffe lassen sich nach Willstätter auf Grund ihrer Löslichkeit in Amylalkohol in drei Gruppen einteilen, die sich in ihrem Glukosidcharakter voneinander unterscheiden. Die Anthocyanidine lassen sich aus saurer Lösung mit Amylalkohol vollständig ausschütteln; die Anthocyanmonoglukoside und die rhamnosehaltigen Diglukoside verteilen sich zwischen Amylalkohol und schwefelsaurer Lösung; die übrigen Anthocyan diglukoside lassen sich mit Amylalkohol aus schwefelsaurer Lösung nicht extrahieren. Dasselbe Verhalten zeigen die Anthocyane auch in Pflanzenextrakten, die mit Schwefelsäure angesäuert sind.

Angesichts der engen Verwandtschaft zwischen Anthocyanen und Flavonolen lag es nun nahe, auch bei den Flavonolen auf ein ähnliches Verhalten gegen Amylalkohol nach Maßgabe ihres Glukosidcharakters zu schließen.

Was den Glukosidcharakter der Flavonole betrifft, so ist die Tatsache auffallend, daß die meisten Flavonole, soweit sie nicht als Aglukone vorkommen, in der Form von Monoglukosiden oder rhamnosehaltigen Diglukosiden bekannt sind, während das Vorkommen rhamnosefreier Anthocyan diglukoside im Pflanzenreich weit verbreitet ist. Rhamnosefreie Flavonoldiglukoside wurden offenbar nur selten bis jetzt als solche charakterisiert. Zu erwähnen ist hier ein Befund Tutins¹, der aus Sennablättern neben Kämpferol eine von ihm Kämpferin benannte Substanz isolierte, die aus Kämpferol und 2 Mol. Glukose besteht ($C_{27}H_{30}O_{16}$). Zur Isolierung dieses Glukosids verwandte er Amylalkohol derart, daß er die saure Ausgangslösung zunächst neutralisierte, worauf er durch vielfach wiederholtes Ausschütteln mit Amylalkohol die Substanz der wäßrigen Schicht entziehen konnte. Wenn auch Tutin keine diesbezüglichen Angaben macht, so geht aus seiner Methode doch wohl hervor, daß das Kämpferin aus saurer Lösung nicht in Amylalkohol übergeht und daß zu seiner Extrahierung aus neutraler wäßriger Lösung große Amylalkoholmengen erforderlich sind. Es scheint sich also dieses Flavonoldiglukosid gegenüber Amylalkohol wie ein rhamnosefreies diglukosidisches Anthocyan zu verhalten.

¹) Tutin. Journ. chem. Soc. Trans. 1913. 103, 2. S. 2006.

Um nun zunächst die rhamnosefreien Anthocyanidglukoside in einfache genetische Beziehung zu den Flavonolen zu bringen, war die Frage zu erledigen, ob die Verbreitung von Flavonolen analoger Glukosidstufe in den Pflanzen nicht größer ist, als bis jetzt bekannt ist und ob ihr Nachweis auf Grund eines den entsprechenden Anthocyaninen ähnlichen Verhaltens gegenüber Amylalkohol geführt werden kann. Dieser Nachweis ließ sich tatsächlich bei einer Reihe von Pflanzenextrakten erbringen und mag hier, ehe auf Einzelheiten eingegangen wird, im Prinzip geschildert werden.

Bei der Untersuchung flavonolhaltiger, mit H_2SO_4 angesäuerter Pflanzenextrakte zeigte sich in der Regel die Tatsache, daß dem Extrakt durch wiederholtes Ausschütteln mit Amylalkohol zuckerfreie und glukosidische Flavonolderivate quantitativ entzogen werden konnten, ohne daß jedoch der Flavonolgehalt der wäßrigen Lösung damit erschöpft worden wäre. Wenn nämlich die mit Amylalkohol ausgewaschene, leicht gelblich gefärbte Lösung in Gegenwart von 15 proz. Schwefelsäure einige Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt wurde, nahm sie einen intensiver gelben Farbton an und gab den Farbstoff an Amylalkohol quantitativ ab. In einer Reihe von Fällen ließ sich nun diese amyalkoholische Lösung mittels Zinkstaub und Magnesium in Gegenwart von Salzsäure zur Farblosigkeit hydrieren, worauf sie, nach Filtrieren über Salzsäure erhitzt, schön rot wurde. Der Farbstoff verhielt sich gegen Na-Acetat usw. wie ein Anthocyanidin, während der Flavonolcharakter der noch nicht hydrierten Substanz dadurch sichergestellt werden konnte, daß sie aus der amyalkoholischen Lösung mit intensiv gelber Farbe in Soda-lösung überging.

In diesen Pflanzenextrakten war also neben den durch Amylalkohol direkt extrahierbaren Flavonolen ein weiteres Flavonol vorhanden, das erst nach Erhitzen mit stärkeren Säuren in Amylalkohol überging, d. h. es muß sich um ein Flavonol handeln, das beim Erhitzen Zucker abspaltet, als Aglukon in Amylalkohol übergeht und gemäß den im vorigen Abschnitt erwähnten Tatsachen bei der Hydrierung sich zunächst in die beständige Anthocyanidinpseudobase umwandelt, die erst beim Erhitzen

sich zum roten Farbsalz isomerisiert. Unter Berücksichtigung der nahen Verwandtschaft zwischen Anthocyanen und Flavonolen und der damit wahrscheinlichen Übereinstimmung im Verhalten gegen Amylalkohol läßt sich daher der Schluß ziehen, daß hier eine Substanz vorliegt, die im frischen Extrakt als rhamnosefreies Diglukosid enthalten ist.

Diese Auffassung konnte noch näher begründet werden durch Ergebnisse, die sich an reinem Cyanin, nach der Vorschrift Willstätters aus Dahliablüten hergestellt, erzielen ließen. Da die Anthocyane eine Reduktionsstufe der Flavonole darstellen, müssen sie durch oxydierende Mittel in Flavonole oder wenigstens in diesen nahestehenden Verbindungen überführt werden können. Wenn nun als Ausgangsmaterial ein diglukosidisches Anthocyanin, in diesem Fall das 2 Mol. Glukose enthaltende Cyanin gewählt wird, muß eine diglukosidische Oxydationsstufe entstehen, deren Verhalten gegen Amylalkohol geprüft werden kann. Eine Oxydation des zuckerfreien Farbstoffs, des Cyanidins, hat Willstätter¹ schon vorgenommen, indem er eine alkoholische Cyanidinlösung mit verdünntem Wasserstoffsuperoxyd erwärmte. Die Lösung wurde farblos und auf Erhitzen mit wenig HCl gelb, worauf er mittels Ätherextraktion ein gut kristallisierendes Produkt gewann, das mit Alkali tief gelbe Lösungen liefert. Weiter ging Willstätter auf die Substanz nicht ein.

Im Anschluß an diesen Befund wurde nun eine Oxydation des Cyanins mit H_2O_2 vorgenommen, wobei aber aus nachher zu besprechenden Gründen vorsichtig verfahren werden mußte. Eine Lösung von 0,05 g Cyaninchlorid in 100 ccm Wasser, das 0,1 Gew. % H_2O_2 enthielt, wurde 17 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und hierauf mit H_2SO_4 angesäuert; die Lösung war fast farblos und wurde nun mit Amylalkohol ausgeschüttelt, der sich leicht gelb färbte und beim Erhitzen über verdünnter Salzsäure nachdunkelte. Die Ausschüttelung wurde mit 3 weiteren Amylalkoholportionen wiederholt; die letzte Portion blieb beim Erhitzen farblos. Wurde nun die mit Amylalkohol ausgewaschene wäßrige Schicht mit H_2SO_4 stärker angesäuert und 3—5 Minuten auf 100^0 erhitzt, so färbte sich

¹) Willstätter und Everest. Lieb. Ann. 1913. 401, 231.

die Lösung stark gelb und gab den Farbstoff quantitativ an Amylalkohol ab. Versuche mit geringeren H_2O_2 -Mengen (0,05—0,01 Gew. %) verliefen ebenso, aber langsamer. Auch wenn die Oxydation in 70proz. Alkohollösung bei 40° vorgenommen wurde, konnte nach Vertreibung des Alkohols bei 40° und Aufnahmen des Rückstands in verdünnter Schwefelsäure mittels Amylalkohol eine Fraktionierung des gelben Oxydationsprodukts in zwei Substanzen vorgenommen werden.

Dieser Befund ist so zu deuten: Die Einwirkung von H_2O_2 hat eine Oxydation des Cyanins zu einem fast farblosen Stoff zur Folge, der ebenso wie die in Pflanzenextrakten enthaltene betreffende Substanz sich beim Erhitzen mit HCl gelb färbt. Ein Teil des Ausgangsmaterials wird jedoch hierbei oxydativ in Zucker und Aglukon gespalten, das in Amylalkohol übergeht und der wäßrigen Lösung durch viermaliges Ausschütteln mit Amylalkohol quantitativ entzogen werden kann. Der größere Teil des Oxydationsprodukts behält jedoch den Zucker bei und ist mit Amylalkohol erst nach der Säurehydrolyse extrahierbar. Die oxydative Zuckerabspaltung konnte mittels der Osazonprobe nachgewiesen werden.

Damit ist wohl die Berechtigung erwiesen, die in Pflanzenextrakten enthaltenen Stoffe, die erst nach Erhitzen mit Säure in eine amyalkohollösliche, zu rotem Farbstoff hydrierten Substanz übergehen, als Flavonoldiglukoside und zwar wahrscheinlich als rhamnosefreie zu betrachten.

Zwischen dem in vitro erhaltenen Oxydationsprodukt des Cyanins und den besagten, in Pflanzenextrakten vorkommenden Stoffen besteht allerdings ein Unterschied insofern, als das Oxydationsprodukt aus Cyanin sich nicht mehr mittels Zn, Mg und Salzsäure zu rotem Farbstoff hydrieren ließ, weder in amyalkoholischer Lösung, noch auch vor der Säurehydrolyse in der wäßrigen Lösung mit und ohne Alkoholzusatz. Es wurde in allen Fällen bei der Reduktion zwar eine Entfärbung erzielt, jedoch erfolgte beim nachherigen Erhitzen höchstens eine Wiederherstellung des gelben Farbtons. Es ist jedoch zu bemerken, daß auch in zahlreichen bis jetzt nicht erwähnten Pflanzenextrakten derselbe Fall angetroffen wurde. Es scheint also.

daß die Oxydation des Cyanins durch H_2O_2 einen tieferen Eingriff in das Molekül bedeutet, der vielleicht nach Analogie der Allocyanidinbildung bei der Hydrierung des Quercetins auf einer Sprengung des Pyronrings beruhen könnte. Um so mehr ist zu betonen, daß selbst dieses stärker veränderte Oxydationsprodukt sich gegenüber Amylalkohol wie ein diglukosidisches, rhamnosefreies Anthocyanin verhält.

Dasselbe Verhalten gegen H_2O_2 zeigten eine Anzahl anderer, chemisch reiner Anthocyanine, die der Verf. der Liebensehrlichkeit ihres Darstellers, Herrn Geh. Rat Prof. Dr. Willstätter, verdankt, nämlich: Violanin, Malvin, Chrysanthemin, Mekocyanin und Pelargonin.

Ob sich bei den Anthocyanen durchweg diese Art der Oxydation in nicht direkt umkehrbarer Weise vollzieht, müßte natürlich erst noch entschieden werden. Es ist dies deshalb nicht wahrscheinlich, weil sich die einzelnen Anthocyane bei der entgegengesetzten Wandlung ihrer Oxydationsstufe verschieden verhalten. So läßt sich nach Willstätter und Mallison¹ das Cyanidin mittels Zinkpulver und Essigsäure leicht zur Farblosigkeit reduzieren und durch Luft-Sauerstoff oder H_2O_2 zurückoxydieren, während das Idaein, ein Monogalaktosid des Cyanidins, sich wohl auf reduktivem Wege entfärben, aber nicht mehr rückoxydieren läßt.

Da die Flavonole infolge ihrer Hydrierbarkeit zu Anthocyanen demnach eine Oxydationszwischenstufe zwischen Anthocyan und den nicht mehr zum Farbstoff hydrierbaren Oxydationsprodukten darstellen, muß es möglich sein, auch das Quercitrin z. B. mittels H_2O_2 in diese höhere Stufe überzuführen. Dies ist in der Tat der Fall; eine wäßrige mit 0,5 oder auch 0,05 Gew. % H_2O_2 versetzte und 2 Tage bei 40° gehaltene Quercitrinlösung läßt sich nicht mehr zu Anthocyan hydrieren: nach der in Amylalkohol vorgenommenen Hydrierung und darauffolgendem Erhitzen resultierten nur farblose, oder bei schwächerer Oxydation (0,05 Gew. % H_2O_2) gelb gefärbte Lösungen.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß die Flavonole und Anthocyane Substanzen leicht wandelbarer Oxydationsstufe

¹) Willstätter und Mallison. Lieb. Ann. 1915. 408, 38.

darstellen, eine Tatsache, die für die physiologische Betrachtung sicherlich von Bedeutung ist. Methodisch wichtig ist ferner der aus diesem und dem vorigen Abschnitt hervorgehende Befund, daß Flavonole und Anthocyane und die ihnen nahestehenden höheren Oxydationsstufen gleicher Glukosidstufe sich in saurer wäßriger Lösung sehr ähnlich gegenüber Amylalkohol verhalten. Wenn von den rhamnosehaltigen Diglukosiden abgesehen wird, ergibt sich folgende Einteilung:

Ia) Anthocyanidin: } mit Amylalkohol leicht extra-
 Ib) Flavonol als Aglukon: } hierbar.

IIa) Anthocyanmonoglukosid: { geht zum Teil in Amyl-
 alkohol, um so mehr, je
 saurer die wäßrige Lösung.

IIb) Flavonolmonoglukosid: { mit Amylalkohol leicht extra-
 hierbar.

IIIa) Anthocyanindiglukosid: } mit Amylalkohol nicht extra-

IIIb) Flavonoldiglukosid: } hierbar.

Ein Unterschied besteht in der Monoglukosidgruppe; dies geht auch daraus hervor, daß in manchen amyalkoholischen Ausschüttelungen aus unerhitzten Pflanzenextrakten der bei der Hydrierung entstehende rote Farbstoff durch Schütteln teilweise in die wäßrige, flavonolfreie Schicht überführt werden kann, also in Amylalkohol weniger löslich ist als das Ausgangsmaterial.

4. Über die Beziehung zwischen Anthocyanen und Flavonolen in einzelnen Pflanzen auf Grund ihrer verschiedenen Glukosidstufe.

Die in den vorigen Abschnitten beschriebenen Methoden wurden dazu verwandt, in einer Reihe von Pflanzen die Glukosidstufe ihrer Flavonole festzustellen, um dadurch eine Beziehung zwischen Anthocyanbildung und Flavonol zu erhalten. Es wurden daher Pflanzenorgane bevorzugt, die in irgendeinem Stadium ihrer Entwicklung Anthocyan enthalten. Ganz allgemein fand sich, daß auch beim Vorhandensein eines rhamnosefreien diglukosidischen Anthocyans neben einer als Diglukosid anzusprechenden Flavonolverbindung Flavonolmonoglukoside oder auch zuckerfreie Flavonole auftreten; ferner können, wie Verf. (a. a. O.) schon festgestellt hat, auch Anthocyanidinpseudo-basen damit vergesellschaftet sein.

1. Zunächst mag die Untersuchung der Blätter von *Ribes aureum* mitgeteilt werden, die Ende August vorgenommen wurde, zu einer Zeit, in der neben rein grünen Blättern intensiv rot gefärbte an demselben Strauch vorhanden waren. Von beiden Blattsorten wurden je 10 g (Frischgewicht) mit 15 ccm 5proz. Schwefelsäure zerrieben, die Filtrate zunächst mit je 6 ccm Amylalkohol puriss. ausgeschüttelt, der nach Waschen mit verdünnter Schwefelsäure weiter untersucht wurde.

a) Grüne Blätter. Der wäßrige Extrakt war leicht gelblich und gab den gelben Stoff an Amylalkohol ab. Beim Erhitzen eines Teils der amyalkoholischen Lösung über Salzsäure vertiefte sich die Farbe etwas, ohne in Rot umzuschlagen; somit war keine Anthocyanidinpseudobase vorhanden. Der andere Teil der amyalkoholischen Lösung wurde mit Zn-Staub über 17proz. Salzsäure in Gegenwart eines Platindrahts als Kontaktmittel bei Zimmertemperatur hydriert, worauf in wenigen Minuten eine starke, rein rote Färbung auftrat; dasselbe war bei vorheriger Verdünnung der Lösung mit frischem Amylalkohol der Fall (vgl. S. 9). Wurde die rote Lösung nun vorsichtig filtriert und mit 1proz. Schwefelsäure ausgeschüttelt, so trat eine Verteilung des Farbstoffs zwischen beiden Schichten ein, derart, daß die größte Menge des Farbstoffs im Amylalkohol blieb; der in die wäßrige Schicht übergegangene Farbstoff verteilte sich weiterhin beim Ausschütteln mit neuen Mengen Amylalkohol. Es war also ein Flavonol vorhanden, das auf Grund der schon in der Kälte vor sich gehenden Farbsalzbildung während der Hydrierung als Glukosid und zwar auf Grund seiner Löslichkeit als Monoglukosid, bzw. rhamnosehaltiges Diglukosid anzusprechen ist. Willstätter gibt an, daß der größte Teil der monoglukosidischen Anthocyane beim Ausschütteln mit Amylalkohol in der wäßrigen Schicht verbleibt und zwar um so mehr, je geringer ihr Säuregehalt ist. Wenn also hier trotz der Anwendung ganz schwacher Säure nur ein Bruchteil in die wäßrige Schicht überging, so muß dies gemäß dem S. 8f. Gesagten auf einer reduktiven Spaltung eines Teils des Glukosids in Zucker und des in Amylalkohol leicht löslichen Aglukons beruhen.

Neben diesem Glukosid war auch noch zuckerfreies Flavonol

vorhanden; dies ging daraus hervor, daß die hydrierte rote Lösung, nach Filtrieren erhitzt, an Farbintensität noch beträchtlich zunahm, d. h., daß also eine bei der Hydrierung entstandene Anthocyanidinpseudobase, die erst bei Erhitzen vor sich gehende Umwandlung in das rote Farbsalz erlitt. Hierbei ist freilich zu berücksichtigen, daß der Farbton eines Anthocyans sich beim Erhitzen vertiefen kann; jedoch war der Farbunterschied im vorliegenden Fall vor und nach dem Erhitzen zu groß, als daß es sich um eine Alteration der glukosidischen Verbindung hätte handeln können. Außerdem konnte Verf. bei Versuchen mit Quercitrin nie eine beträchtliche Verstärkung des Farbtons beim Erhitzen der hydrierten roten Amylalkohollösungen feststellen.

Die beiden erwähnten Flavonole ließen sich mittels viermaliger Amylalkoholausschüttelung dem sauren Blätterextrakt vollständig entziehen, derart, daß sich die letzte Ausschüttelung nach Reduktion und folgendem Erhitzen nur noch kaum sichtbar rosa anfärbte. Die so ausgewaschene wäßrige Schicht wurde nun mit H_2SO_4 versetzt, so, daß der Gehalt zirka 15 % betrug, und einige Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt; hierbei nahm die Lösung gelbe Farbe an, deren Träger sich mit Amylalkohol quantitativ extrahieren ließ. Die amylnalkoholische Lösung wurde nun mit Zn und Mg über 17proz. Salzsäure unter Abkühlung hydriert, worauf sie blaßrot wurde und beim Erhitzen rein dunkelrote Farbe annahm. Der Farbstoff verhielt sich gegen Na-Acetat usw. wie ein Anthocyanidin. Es war also offenbar eine (rhamnosefreie) diglukosidische Flavonolverbindung vorhanden, die erst nach der Säurehydrolyse ihr Aglukon an Amylalkohol abgab, so daß bei der Hydrierung zunächst die beständige Anthocyanidinpseudobase entstand und erst beim Erhitzen die Isomerisierung zum Farbsalz erfolgte. Bemerkenswert ist, daß die Hydrierfähigkeit des aus dem Diglukosid abgespaltenen Aglukons bei längerem Erhitzen verloren geht und daher die Säurehydrolyse nicht länger als nötig ausgedehnt werden durfte.

b) Rote Blätter. Der wäßrige Extrakt war tiefrot gefärbt und gab an Amylalkohol etwas roten Farbstoff ab, so daß die Ausschüttelung hellrot, um ein Vielfaches geringer als die

wäßrige Schicht, gefärbt war. Da dieser Farbstoffanteil aus der amyalkoholischen Lösung auch nicht in Spuren mit ganz schwacher Säure extrahiert werden konnte, lag hier genuines Anthocyanidin in Form seines roten Farbsalzes vor. Wurde ein Teil der amyalkoholischen Lösung über Salzsäure erhitzt, so trat eine intensiv rote Färbung auf; es war also außerdem eine beträchtliche Menge Anthocyanidinpseudobase anwesend. Bei der unter Abkühlung vorgenommenen Hydrierung des anderen Teils der amyalkoholischen Lösung trat sofort eine Nachdunklung der ursprünglich hellroten Lösung auf, die aber auch bei Fortsetzung der Hydrierung nicht besonders stark wurde; es war also eine im Gegensatz zu den grünen Blättern nicht beträchtliche Menge eines Flavonolmonoglukosids vorhanden.

Hier war die Frage zu erörtern, ob das Auftreten der roten Farbe bei der Hydrierung tatsächlich auf dem Vorhandensein eines Flavonols beruhte und nicht dadurch bedingt war, daß ein Teil der ja ebenfalls vorhandenen Anthocyanidinpseudobase auf Grund der bei der Hydrierung auftretenden, wenn auch lokalisierten, Reaktionswärme sich ins Farbsalz umwandelte. Diese Möglichkeit wurde an einer neutralen wäßrigen Lösung reinen Cyanidins nachgeprüft, das durch Stehenlassen zur Pseudobase isomerisiert und hierauf nach Ansäuern in Amylalkohol aufgenommen worden war: selbst nach zweistündiger Hydrierung war keine Rötung erfolgt. Es besteht also die obige Folgerung zu Recht.

Wie bei den grünen Blättern, ließ sich auch hier die wäßrige Ausgangslösung durch viermaliges Waschen mit Amylalkohol vollständig von den angeführten Substanzen befreien und war, wie erwähnt, tiefrot gefärbt; sie enthielt also Anthocyanin als rhamnosefreies Diglukosid, das erst nach Erhitzen mit stärkerer Schwefelsäure sein Aglukon an Amylalkohol abgab.

Aus diesen an grünen und roten Blättern erhaltenen Befunden lassen sich nun genetische Beziehungen zwischen Flavonol und Anthocyan herstellen. Jedoch bleiben sie in zwei Punkten lückenhaft, da in den Extrakten aus roten Blättern weder das Vorhandensein von zuckerfreiem Flavonol noch von diglukosidischem geprüft werden konnte. Das eine war unmöglich, weil

die nach der Hydrierung vorzunehmende Erhitzung gleichzeitig die reichlich vorhandene Anthocyanidinpseudobase zum Farbsalz isomerisierte, das andere, weil die nach der Säurehydrolyse vorgenommene Amylalkoholausschüttelung auch das abgespaltene Anthocyanidin in großer Menge enthielt. Diese Lücke ist jedoch bedeutungslos; denn das Vorhandensein der beiden betreffenden Stoffe auch in den roten Blättern ist schon aus dem Grunde anzunehmen, weil die künstliche Flavonolhydrierung nicht quantitativ verläuft.

Es lassen sich also zwischen den einzelnen Flavonolen und Anthocyanen der Ribesblätter folgende Beziehungen aufstellen:

grüne Blätter:		rote Blätter:
1. zuckerfreies Flavonol, kein Anthocyanidin,	→	viel Anthocyanidinpseudobase und etwas zuckerfreies Farbsalz,
2. viel Flavonolmonoglukosid (bzw. rhamnosehaltiges Di- glukosid),	↗	wenig Flavonolmonoglukosid (bzw. rhamnosehaltiges Diglu- kosid),
3. viel Flavonoldiglukosid, kein Anthocyanindiglukosid,	→	viel Anthocyanindiglukosid (vermutlich auch Flavonol- diglukosid).

Dieselben Flavonole, die in den grünen Blättern im August gefunden wurden, ließen sich nun schon in ganz jungen, grünen Blättern im April wie auch während des Sommers nachweisen, wenn auch der Flavonolgehalt der jungen Blätter im ganzen etwas geringer war. Infolgedessen ist wohl der Schluß berechtigt, daß in den Ribesblättern zur Zeit der herbstlichen Rötung eine Hydrierung der verschiedenen Flavonole stattfindet, die, soweit die Hydrierung des Flavonoldiglukosids in Betracht kommt, ihren sichtbaren Ausdruck in der Rötung des Blattes findet; gleichzeitig scheinen Zuckerabspaltungen vor sich zu gehen, da der Gehalt an Flavonolmonoglukosid, bzw. rhamnosehaltigem Diglukosid, in roten Blättern abnimmt und dafür in diesen eine starke Anreicherung an Aglukon in hydrierter Stufe nachweisbar ist.

Zu bemerken ist noch, daß die rot gefärbten Blätter zur Zeit der Untersuchung nicht als absterbende zu betrachten waren, da sie sich noch wochenlang frisch am Strauch erhielten,

wenn auch ihre Chloroplasten desorganisiert waren. Auf diesen Befund ist noch späterhin zurückzukommen.

Da verdünnte Schwefelsäure nicht das günstigste Extraktionsmittel für Flavonole darstellt, wurde noch eine Extraktion in alkoholischer wäßriger Lösung vorgenommen, um noch einige weitere Eigenschaften der betreffenden Stoffe untersuchen zu können. 50 g frische grüne Blätter wurden im August mit schwach soda-alkalischem Wasser extrahiert und das intensiv gelbe Filtrat mit Schwefelsäure ganz schwach angesäuert. Die Lösung wurde im Vakuumexsikkator bei 37° fast zur Trockne eingedampft, der braungelbe Rückstand mit Methylalkohol aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Hierbei ging ein Teil der Substanz gelb in Lösung (I), ein anderer blieb als gelber Rückstand (II) zurück.

Die mit Wasser verdünnte Lösung (I) wurde mit FeCl_3 dunkelgrün und gab mit Bleiazetat einen gelben Niederschlag, der sich beim Erhitzen nicht veränderte. Nach Vertreibung des Methylalkohols und Ansäuern ließ sich der gelbe Farbstoff mit Amylalkohol fast vollständig extrahieren.

Der Rückstand II wurde mit Amylalkohol aufgenommen, worin er sich teilweise löste. Der abfiltrierte Rückstand wurde mit Methylalkohol gewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos abfloß, und in Wasser aufgenommen, worin er sich leicht mit orangegelber Farbe löste. FeCl_3 -Zusatz gab auch hier grüne Färbung, jedoch war der Niederschlag mit Bleiazetat nur leicht gelblich gefärbt. Die mit Säure versetzte Lösung gab ihren Farbstoff erst nach Erhitzen an Amylalkohol ab; die amylnalkoholische Lösung entfärbte sich bei der Hydrierung mit Zn und Mg und wurde bei darauf folgendem Erhitzen rein rot.

Es unterscheidet sich also die als rhamnosefreie Flavonoldiglukosid anzusprechende Substanz von den übrigen Flavonolen der Ribesblätter durch ihre geringe Löslichkeit in Methyl- und Amylalkohol, wie auch durch die blasse Farbe ihres Bleiniederschlags; diese könnte freilich auch für eine der amylnalkohollöslichen Komponenten typisch sein und von der intensiven Färbung der anderen Komponente verdeckt werden.

2. Im Prinzip gleich verhielten sich die sauren Auszüge, die aus *Pelargonium*laubblättern gewonnen wurden. Die

farblosen Extrakte aus grünen Blättern gaben an Amylalkohol leicht gelblichen Farbstoff ab, der beim Erhitzen über Salzsäure stärker gelb wurde; Reduktion in der Kälte ergab auch in verdünnten Amylalkohollösungen schön roten Farbstoff mit Anthocyancharakter, dessen Farbton sich beim Erhitzen nur unwesentlich verstärkte. Mit der dritten amyalkoholischen Ausschüttelung war die wäßrige Lösung von dieser Flavonolkomponente befreit und nahm beim Erhitzen mit 15proz. Schwefelsäure eine gelbe Färbung an, die quantitativ in Amylalkohol überging. Wurde diese Amylalkohollösung nun mit $\text{Zn} + \text{Mg}$ hydriert, so entfärbte sie sich und wurde beim Erhitzen hellrot. Es war also eine monoglukosidische, eventuell rhamnosehaltige diglukosidische, Flavonolverbindung gepaart mit einem rhamnosefreien Flavonoldiglukosid vorhanden. In roten Blättern derselben Pflanze konnte das amyalkohollösliche Flavonol und rhamnosefreies diglukosidisches Anthocyanin nachgewiesen werden.

Aglukone in Form von zuckerfreiem Flavonol bzw. Anthocyanidinpseudobase waren weder in grünen noch in roten Blättern vorhanden.

Erwähnenswert ist, daß die mittels künstlicher Hydrierung aus dem diglukosidischen Flavonol erhaltene Anthocyanidinemenge beträchtlich geringer ist, als nach der starken Gelbfärbung der Lösung vor dem Hydrieren verwertet werden konnte. Dies beruht offenbar auf der Unbeständigkeit der gelben Substanz gegen das Erhitzen, das zur Abspaltung des Aglukons vorgenommen wurde; eine Tatsache, die, wie S. 17 erwähnt, auch bei den Ribesblättern, wenn auch in geringerem Maß, in Erscheinung trat. Ein Beweis hierfür ist in dem Verhalten des amyalkohollöslichen Flavonols, das aus dem noch nicht erhitzten Pelargoniumblätterextrakt gewonnen wurde, gegeben. Wurde dieses Flavonol in seiner amyalkoholischen Lösung in Gegenwart von Säure erhitzt und dann erst hydriert, so entstand zunächst, da nun natürlich eine Zuckerabspaltung eingetreten war, eine farblose Lösung, die auf Erhitzen rot wurde, aber bedeutend schwächer gefärbt war als eine ohne vorheriges Erhitzen hydrierte Kontrollösung. Eine direkte Hydrierung des Flavonoldiglukosids in seiner wäßrigen

Lösung schlug fehl, auch als die Lösung, um eine Bremsung der Hydrierung zu erzielen, mit verschiedenen Alkoholmengen versetzt wurde.

Junge grüne Blätter verhielten sich wie die alten.

3. Laubblätter von *Zea Mays*, die im September untersucht wurden, zeigten dieselbe Erscheinungen. Der saure gelbliche Extrakt aus grünen Blättern gab seinen Farbstoff an Amylalkohol quantitativ ab; die amyalkoholische Lösung wurde beim Hydrieren nach 8 Minuten stark violettrot, ohne daß die Farbstoffmenge beim Erhitzen zunahm. Nach dreimaligem Waschen mit Amylalkohol war diese Glukosidstufe der wäßrigen Schicht vollständig entzogen; diese enthielt jedoch noch ein weiteres Flavonol: auf Erhitzen mit 15proz. Schwefelsäure wurde die Lösung intensiv gelb und gab ihren Farbstoff an Amylalkohol quantitativ ab, worauf die Lösung durch Hydrieren und folgendes Erhitzen hellrot wurde.

In roten Blättern derselben Maispflanze war neben dem amyalkohollöslichen Flavonol ein rhamnosefreies diglukosidisches Anthocyanin vorhanden.

Junge grüne Maisblätter aus 14 Tage alten Sägemehlkulturen verhielten sich wie alte grüne Blätter.

4. Verf. hat in seiner früheren Arbeit (a. a. O. S. 616) einige Angaben über den Flavonol- und Anthocyangehalt von *Ampelopsis hederacea* gemacht, die auf Grund der in vorliegender Untersuchung eingeschlagenen Methode erweitert werden konnten. In dem amyalkoholischen Auszug aus dem sauren Extrakt grüner Blätter im Juli fanden sich große Mengen sowohl von Flavonolmonoglukosid bzw. rhamnosefreiem Diglukosid, als auch von einer Anthocyanidinpseudobase: die amyalkoholische Ausschüttelung wurde bei der Hydrierung in Eiswasser, auch nach vorheriger Verdünnung mit frischem Amylalkohol, sehr rasch intensiv rot, ebenso beim Erhitzen über Salzsäure ohne Hydrierung. Aus den bei der Besprechung der Ribesblätter (S. 16f.) angeführten Gründen ist auch hier tatsächlich das Vorhandensein der beiden erwähnten Substanzen anzunehmen, wofür noch ein weiterer Anhaltspunkt in ihrem verschiedenen Verhalten gegen Amylalkohol gegeben war: vier weitere amyalkoholische Ausschüttelungen wurden beim Erhitzen über Salzsäure noch

ziemlich stark rot in abnehmendem Maß, während schon die dritte Extraktion auf dem Weg der Hydrierung nur noch geringe Farbstoffmengen lieferte; um die letzten Spuren der Anthocyanidinpseudobase zu entfernen, mußte die wäßrige Lösung zwölfmal ausgewaschen werden. Die so extrahierte wäßrige Lösung wurde beim Erhitzen mit stärkerer Säure tiefgelb und gab den Farbstoff quantitativ an Amylalkohol ab. Die Hydrierung und Erhitzung der Amylalkohollösung ergab eine hellrote Färbung, die wie bei den Pelargoniumblättern relativ schwach war; bei sehr langer Hydrierung (10 Stunden) war die Färbung wesentlich stärker. Besser ging in diesem Fall die Hydrierung in der wäßrigen Lösung unter Alkoholzusatz vor sich, bei der eine ziemlich starke Rotfärbung resultierte.

Im Prinzip gleich verhielten sich rote Blätter; ihr Anthocyanin war ein rhamnosefreies Diglukosid.

5. Ein hierher gehöriger Befund an den Laubblättern von *Lilium candidum* mag späterhin in anderem Zusammenhang geschildert werden. Es sollen dagegen noch einige Befunde an besonders flavonolreichen Organen erwähnt werden, wenn diese auch auf Grund ihrer Funktion nicht unter dem Gesichtspunkt der Assimilation, der für die vorliegende Untersuchung maßgebend war, betrachtet werden können.

6. So wurde z. B. aus den gelben Blüten von *Forsythia suspensa* mittels Extraktion durch 10proz. Schwefelsäure eine gelbe Lösung gewonnen, aus der mit Amylalkohol ein gelbgrüner Stoff erschöpfend extrahiert werden konnte. Diese Substanz wurde bei der Hydrierung in der Kälte schön rot und verteilte sich zwischen Amylalkohol und wäßriger Schicht. Es lag also ein Flavonolmonoglukosid oder rhamnosehaltiges Diglukosid vor. Die ausgewaschene, noch ziemlich stark gelb gefärbte wäßrige Schicht wurde mit stärkerer Schwefelsäure und etwas Salzsäurezusatz erhitzt dunkler gelb und gab den Farbstoff hierauf quantitativ an Amylalkohol ab; dieser konnte durch zweistündiges Hydrieren und darauffolgendes Erhitzen zu einem schön roten Farbstoff reduziert werden, der beim Neutralisieren mit Na-Azetat in Violetttrot umschlug. Außer dem ersterwähnten Flavonol war also in diesen Blüten noch ein zweites (rhamnosefreies) diglukosidisches vorhanden.

7. Ferner wurden die bekanntlich sehr Quercetinreichen Schalen der Küchenzwiebel untersucht. Der gelbliche saure Extrakt gab an Amylalkohol seinen Farbstoff ab, der bei der Hydrierung farblos und erst bei darauffolgendem Erhitzen dunkelrot wurde, entsprechend dem aglukonischen Charakter des Quercetins. Nach nochmaliger Extraktion mit Amylalkohol war der Quercetingehalt der wäßrigen Lösung erschöpft; jedoch dunkelte diese beim Erhitzen mit stärkerer Schwefelsäure nach und gab ihren Farbstoff quantitativ an Amylalkohol ab, der bei der Hydrierung farblos, beim folgenden Erhitzen hellrot wurde. Also lag auch hier neben dem zuckerfreien Flavonol ein diglukosidisches, bis jetzt offenbar noch nicht untersuchtes Flavonol vor.

In einer anderen Gruppe von Fällen war das Anthocyanin der Blätter zwischen Amylalkohol und saurer wäßriger Lösung verteilbar, lag also als Mono- bzw. rhamnosehaltiges Diglukosid vor. Bei diesen Blättern genügte natürlich die Feststellung eines amyalkohollöslichen Flavonolglukosids, um eine genetische Beziehung zwischen Anthocyan und Flavonol annehmen zu können. Jedoch wurden die betreffenden Extrakte auch auf diglukosidische Verbindungen hin untersucht, die sich tatsächlich nachweisen ließen, jedoch auf keine Weise zu roten Farbstoffen hydriert werden konnten, sich also so verhielten, wie das S. 12 beschriebene, durch H_2O_2 -Einwirkung erhaltene Oxydationsprodukt aus reinem Cyanin. Ob hier eine gesetzmäßige Beziehung besteht, müßte an umfangreichem Material geprüft werden, wozu jedoch bei dem Zweck der vorliegenden Untersuchung keine Veranlassung vorlag.

Einige der hierhergehörigen Beispiele mögen, soweit sie für die im nächsten Abschnitt zu besprechenden Punkte von Belang sind, hier mitgeteilt werden.

Die Blätter zahlreicher Hederarassen sind bekanntlich in der kalten Jahreszeit mehr oder weniger rot gefärbt. Das Anthocyan der hier untersuchten Pflanze war ein Anthocyanmono- bzw. rhamnosehaltiges Diglukosid. Die amyalkoholische Ausschüttelung von rein grünen Blättern wurde beim Hydrieren sofort schön rot, derart, daß sich der Farbstoff zwischen Amyl-

alkohol und der wäßrigen Schicht verteilen ließ; beim Erhitzen dunkelte die amyalkoholische Lösung in einer Weise nach, die auf das gleichzeitige Vorhandensein einer Anthocyanidinpseudobase zurückgeführt werden mußte. Da die rasche Hydrierung in Gegenwart von Salzsäure erhitze Lösung sich nicht rot, nur dunkler gelb färbte, war also in den Blättern ein zuckerfreies und ein monoglukosidisches, eventuelle Rhamnosehaltiges, diglukosidisches Flavonol vorhanden. Nach vollständigem Auswaschen dieser beiden Flavonole blieb die wäßrige Schicht noch stark gelb und gab nach Erhitzen mit stärkerer Säure den Farbstoff quantitativ an Amylalkohol ab, ohne daß dieser jedoch zu rotem Farbstoff hydriert werden konnte.

Die beiden amyalkohollöslichen Flavonole konnten auch in roten Blättern nachgewiesen werden, wobei die nur geringe Menge des in den Amylalkohol übergehenden Anthocyaninanteils nicht störte.

Interessant ist das Verhalten von *Cinnamomum Burmanniana*, deren Blätter in der Jugend rein weiß sind oder die verschiedenste Rotfärbung bis zu satter Tönung aufweisen, während sie späterhin rein grün werden und, auch im Mikroskop untersucht, sich frei von Anthocyan erweisen. Das Anthocyanin der roten Blätter war ein Mono- bzw. rhamnosehaltiges Diglukosid. Der Flavonolgehalt junger und alter Blätter war verschieden: Die amyalkoholische Ausschüttelung aus den Extrakten junger Blätter wurde beim Hydrieren, auch nach Verdünnen der Lösung mit weiterem Amylalkohol, sofort schön rot und dunkelte beim Erhitzen nach zu undurchsichtigem Rot, während dieselbe Lösung aus alten Blättern beim Hydrieren nur blaßrosa und erst beim Erhitzen dunkelrot wurde. In jungen Blättern war also Flavonol als Aglukon und Monoglukosid (eventuell rhamnosehaltiges Diglukosid) vorhanden, während die alten Blätter nur Aglukon aufwiesen, so daß also wohl eine fermentative Zuckerabspaltung im Lauf der Blattentwicklung anzunehmen ist. Anthocyanidinpseudobase war in keinem Fall vorhanden. Nach Auswaschen der erwähnten Flavonole mit Amylalkohol blieb auch hier eine Substanz zurück, die nach Erhitzen mit stärkerer Säure in Amylalkohol übergang und sich nicht zu rotem Farbstoff hydrieren ließ.

Aus der Zahl der weiteren Untersuchungen seien noch kurz folgende erwähnt: Rote Blätter von *Rheum australe* enthielten ein Anthocyanmono- bzw. rhamnosehaltiges Diglukosid und daneben, wie rein grüne Blätter desselben Individuums, die entsprechende Flavonolstufe in großer Menge. In diesem Falle sprach nichts für das Vorhandensein einer amyalkoholunlöslichen Diglukosidverbindung. Ebenso verhielten sich die roten und grünen Herbstblätter von *Lamium purpureum*.

Eine weitere Gruppe von Pflanzen mit anthocyanbildenden Blättern bietet der Untersuchung, nach der hier angewandten Methode, Schwierigkeiten auf Grund ihres Gehaltes an rotbildenden Gerbstoffen, worüber später noch näheres auszuführen sein wird.

5. Anthocyanbildung und Assimilationstätigkeit.

a) Vorbemerkung.

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Befunde zeigen, daß in Blättern, die zur Anthocyanbildung befähigt sind, jederzeit Oxydationsstufen der Anthocyane angetroffen werden, die ihrer Glukosidstufe nach mit dem Anthocyanin der betreffenden Blätter übereinstimmen. Es ist also wohl anzunehmen, daß das Anthocyan in solchen Organen nicht erst zur Zeit der Blattrötung aus einzelnen Bausteinen synthetisiert wird, sondern seinen Ursprung einer einfachen Hydrierung eines schon vorhandenen Flavonolglukosides oder in anderen Fällen vielleicht einer etwas stärker oxydierten Ausgangssubstanz verdankt. Unter diesem Gesichtspunkt soll nun hier der Chemismus der Anthocyanbildung einer allgemeineren Betrachtung unterzogen werden.

Bekanntlich wird eine Reihe von Faktoren physikalischer und chemischer Art für die Anthocyanbildung in vegetativen Organen verantwortlich gemacht. Soweit Faktoren stofflicher Art in Betracht kommen, läßt sich eine Gliederung in zwei Gruppen vornehmen, insofern, als bei dem einen Teil dieser Faktoren an eine direkte Beteiligung bei der Anthocyansynthese als Bausteine gedacht werden kann, während die Wirkung des anderen Teils sicherlich nur auf indirektem Wege zu er-

klären ist. Zur ersten Gruppe gehören einige Zuckerarten, das Phloroglucin und das Phloridzin, die nach Overton¹ und Czartkowski² eine vitale Rötung von Blättern hervorrufen können; zur zweiten unter allen Umständen nur indirekt wirkenden Gruppe sind die Alkohole und anderen Narkotika (Overton¹) zu rechnen; außerdem gehört hierher die Anthocyanbildung auf Grund mangelhafter Mineralsalznahrung, wie N- und P-Entzug (Czartkowski, Suzuki³, Overton⁴), ferner die bis jetzt noch nicht bekannte Tatsache, daß CO₂-Entzug bei gleichzeitiger Belichtung Anthocyanbildung zur Folge hat. Auf diesen letzten Punkt wird weiter unten näher eingegangen werden.

Im folgenden soll nun gezeigt werden, daß auch die Überschwemmung der Blätter mit Zucker nur indirekt bei der dabei vor sich gehenden Anthocyanbildung beteiligt ist und ebenso die Wirkung des Phloroglucins usw. wohl nur mittelbarer Art ist.

b) Die Beziehung zwischen Anthocyanbildung und künstlicher Zuckierzufuhr.

Ein günstiges Objekt für solche Versuche stellt das Laubblatt von *Lilium candidum* dar, das schon Overton untersucht hat; in eigenen Versuchen trat wenige Tage nach Einstellen der Blätter in eine Lösung von z. B. 2% Glukose bei hinreichender Belichtung eine starke Anthocyanbildung im Mesophyll auf, während im Dunkeln die Rötung nur gering oder gar nicht vorhanden war.

Zunächst wurde nun die Glukosidstufe des gebildeten Anthocyanins festgestellt und geprüft, ob in frischen, nicht mit Zucker vorbehandelten Blättern, eine entsprechende flavonolische Glukosidstufe vorhanden war. Es ergab sich, daß in diesem Fall zwei Anthocyanine verschiedenen Glukosidcharakters vorhanden waren: eine geringe Menge Anthocyanmonoglukosid, bzw.

¹) Overton. Jahrb. f. wiss. Bot. 1899. 33, 171.

²) Czartkowski. Ber. d. d. bot. Ges. 1914. 32, 407.

³) Suzuki. Bull. agric. Tokyo. 1906—1908. 7, 29. (Ref. Justs bot. Jahresber. 1907. 33, 1, S. 905.)

⁴) Overton. l. c. S. 179.

rhamnosehaltiges Diglukosid und als Hauptbestandteil ein rhamnosefreies Diglukosid. Die drei ersten amyalkoholischen Ausschüttelungen aus dem sauren, tiefroten Blätterextrakt waren nämlich leicht rot gefärbt und ließen sich beim Waschen mit 10proz. Schwefelsäure nur teilweise von dem Farbstoff befreien; die weiteren Ausschüttelungen waren dagegen farblos, während die wäßrige Schicht noch tiefrot war. Die Untersuchung der ersten drei amyalkoholischen Auszüge ergab das Vorhandensein einer geringen Menge Flavonolmonoglukosids, bzw. rhamnosehaltigen Diglukosids, einer großen Menge zuckerfreien Flavonols und das Fehlen einer Anthocyanidinpseudobase: Bei der Hydrierung in der Kälte trat eine geringe Vertiefung des blaßroten Farbtons auf, auch in verdünnter amyalkoholischer Lösung, während nach folgendem Erhitzen über HCl die Lösungen tiefrot wurden; der Farbstoff verhielt sich gegen Na-Azetat usw. wie ein Anthocyanidin. Erhitzen ohne vorherige Hydrierung hatte keine Vertiefung der blaßroten Färbung zur Folge.

Die Untersuchung frischer grüner Blätter ergab, soweit die amyalkohollöslichen Flavonole in Betracht kommen, dasselbe Resultat. Außerdem konnte ein rhamnosefreies Flavonoldiglukosid in großer Menge nachgewiesen werden: nachdem die wäßrige Schicht mittels fünfmaliger Amyalkoholextraktion von den oben genannten Substanzen vollständig befreit war, färbte sie sich beim Erhitzen mit stärkerer Schwefelsäure in 5 Minuten intensiv gelb und gab den Farbstoff quantitativ an Amyalkohol ab; diese amyalkoholische Lösung ließ sich mit Zn + Mg und Salzsäure zu einer farblosen oder schwach rot gefärbten Lösung hydrieren, die beim Erhitzen mit Salzsäure nach der Filtration tiefrot wurde und beim Auswaschen der Säure mit Na-Azetat violettrote Färbung annahm.

Diese Resultate wurden während des ganzen Jahres, auch bei den während des Winters vorhandenen grundständigen Blättern erhalten. Auch die Mengenverhältnisse wiesen keine Schwankungen auf, soweit es mit dem Auge beurteilt werden konnte.

Es ergibt sich also auch in diesem Falle, daß zur Anthocyanbildung jederzeit die entsprechende flavonolische Glukosidstufe zur Verfügung steht.

Auf Grund dieser Befunde wurde nun versucht, der Beziehung näher zu kommen, die zwischen Zuckerdarreichung und Anthocyanbildung bei den Liliumlaubblättern besteht. Aus dem Gesagten ergibt sich schon, daß es nicht nötig ist, den aufgenommenen Zucker direkt als Baustein bei einer Anthocyan-synthese zu betrachten; jedoch wäre es denkbar, daß aus dem überschüssigen Zucker Flavonole gebildet werden, die, sobald ein gewisser Flavonolgehalt in den Zellen überschritten wird, mit Hilfe des Lichtes zu Anthocyan hydriert werden. Auch diese Möglichkeit ist auf Grund folgender Versuche zu ver-neinen:

Eine größere Zahl frischer Blätter wurde in 4 Serien auf- geteilt; zwei davon wurden in 2proz. Glukoselösung teils be- lichtet, teils verdunkelt gehalten, die beiden anderen Serien wurden in Wasser gestellt und ebenfalls teils belichtet, teils verdunkelt. Nach 2 Tagen, als sich in den belichteten Zucker- blättern ein leichter Anflug von Rötung zeigte, wurde die erste Untersuchung vorgenommen, nach 4 Tagen, als die belichteten Zuckerblätter stark rot gefärbt waren, die zweite. Die Blätter im Wasser und die verdunkelten Zuckerblätter waren auch nach 4 Tagen frei von Anthocyan. Sämtliche Versuche wurden unter quantitativ gleichen Verhältnissen ausgeführt: je 10 g Blätter (Frischgewicht) wurden in 25 ccm 10proz. Schwefelsäure zerrieben und das Filtrat fünfmal mit je 6 ccm Amylalkohol ausgeschüttelt; die weitere Untersuchung ging in der schon beschriebenen Weise vor sich. Das Resultat sämtlicher Untersuchungen war, daß der Gehalt an den ver- schiedenen Flavonolen, kolorimetrisch bestimmt an den roten Hydrierungsprodukten, in allen vier Serien derselbe war und übereinstimmte mit dem Gehalt frisch von der Pflanze entnommener Kontrollblätter. Eine Lücke blieb insofern, als der Gehalt an rhamnosefreiem Flavonoldiglukosid bei der zweiten Untersuchung in den roten Zuckerblättern nicht ermittelt werden konnte, da ja dieses die- selben Löslichkeitsverhältnisse besitzt, wie das inzwischen reichlich gebildete Anthocyanin und von ihm überdeckt wurde. Es ist natürlich theoretisch möglich, die nach der Säurehydrolyse der wäßrigen Schicht gewonnene Amylalkohollösung zu hydrieren

und die nach Erhitzen auftretende Vertiefung des roten Farbtons kolorimetrisch zu bestimmen. Jedoch ist diese Methode nicht brauchbar, da beim Hydrieren ein Teil des aus dem genuinen Anthocyanin abgespaltenen Anthocyanidins in die farblose Leukobase übergehen kann.

Eine Veränderung des Flavonolgehaltes konnte dann beobachtet werden, wenn die Blätter bis zur Vergilbung den obigen Versuchsbedingungen unterworfen wurden. In diesem Fall, der im Dunkeln früher als im Hellen einsetzte, ist eine deutliche Anreicherung, besonders an amyalkoholunlöslichem Flavonol-diglukosid, zu konstatieren, die aber ebenfalls von der Zuckerdarreichung unabhängig war. Es scheint also, daß beim Absterben irgendwelche, die Flavonolbildung begünstigende Umsetzungen stattfinden.

Aus diesen Befunden ist also der Schluß zu ziehen, daß der von außen gebotene Zucker nicht als Baustein bei einer Anthocyan- bzw. Flavonolsynthese gedient hat, sondern daß der Einfluß des Zuckerüberschusses ebenso indirekter Art sein muß, wie es bei den meisten anderen Anthocyanbildung begünstigenden Faktoren von vornherein anzunehmen ist; d. h., daß er die Hydrierung der schon vorhandenen Flavonole zu Anthocyanen begünstigt.

Dadurch vereinfacht sich natürlich die Betrachtung der die Anthocyanbildung befördernden Faktoren und es kann die S. 26f. vorgenommene Gruppierung der stofflichen Faktoren, wenn zunächst vom Phlorogluzin und Phloridzin abgesehen wird, annulliert werden. Daß die direkte Wirkung auch der beiden letztgenannten Stoffe sehr zweifelhaft ist, soll späterhin erörtert werden.

c) Die Abhängigkeit der Anthocyanbildung von der Assimilationsleistung.

Es erhebt sich damit die Frage, ob es möglich ist, die sämtlichen Faktoren, die eine Anthocyanbildung in vegetativen Organen begünstigen, unter einem einzigen Gesichtspunkt zu betrachten, um damit eine Klärung des Anthocyanstoffwechsels anzubahnen.

Diese Möglichkeit sieht der Verf., wie eingangs schon erwähnt, ganz allgemein in der Beziehung gegeben, die zwischen Anthocyanbildung und CO_2 -Assimilation hergestellt werden kann. Aus dem vorhergehenden ergibt sich, daß es sich hierbei nicht um eine indirekte, etwa durch die Assimilation geschaffene Zuckeranreicherung handeln soll, eine Beziehung, wie sie von Overton bei der Beförderung der Anthocyanbildung durch Narkotika angenommen wird, sondern daß der Chemismus der Assimilation in Betracht gezogen werden soll.

Zunächst ist hier auf die außerordentliche, noch längst nicht genügend durchforschte Verbreitung der Flavonole im Pflanzenreich hinzuweisen. Im besonderen scheint jedes Anthocyanvorkommen in vegetativen Organen von einer flavonolischen Oxydationsstufe begleitet oder vorbereitet zu sein. In den mehr als hundert vom Verf. untersuchten vegetativen Organen, die anthocyanhaltig sind oder die Fähigkeit der Anthocyanbildung besitzen, wurden nie die Flavonole vermißt; und daß Flavonole auch in der Pflanze selbst, wie *in vitro* zu Anthocyanen hydriert werden können, hat der Verf. (a. a. O.) teils an der lebenden Pflanze (*Polygonum compactum*), teils an Autolysaten (*Paeonia*) gezeigt. Aus diesem letzten Grunde sieht der Verf. in der derzeitigen Unkenntnis von der konstitutionellen Übereinstimmung zwischen Anthocyan und Flavonol eines und desselben Organes kein Hindernis für die Voraussetzung, daß diese beiden Stoffe, soweit sie in der Glukosidstufe gemäß den beschriebenen Ergebnissen übereinstimmen, ineinander übergehen, zumal eine solche Konstitutionsübereinstimmung wenigstens in einem Fall, in den Blüten von *Viola tricolor*, durch Everest (vgl. S. 5) sehr wahrscheinlich gemacht wurde.

Es soll nun geprüft werden, wie sich diese Betrachtungsweise aus den an Pflanzen gemachten Beobachtungen rechtefertigen läßt, wobei die Lokalisation des Anthocyans zunächst außer Betracht bleiben soll.

Sehr viele Blätter führen während ihrer Entfaltung im Frühjahr Anthocyan, das im Laufe der Entwicklung mehr oder weniger rasch verschwindet. Wenn auch schon den jungen Blättern im allgemeinen eine Assimilationsleistung zugesprochen

werden muß und nach Willstätter¹ die Assimilation solcher Blätter, bezogen auf den Chlorophyllgehalt, größer ist als späterhin, bleibt sie doch in der Regel auf Grund des relativ zum gleichen Frischgewicht geringeren Chlorophyllgehaltes hinter der Leistung der voll entwickelten Blätter zurück. Jugendrote Blätter scheint Willstätter nicht untersucht zu haben; eine Untersuchung solcher Blätter dürfte wohl noch größere Verschiedenheit in der Assimilationsleistung gegenüber den älteren entröteten ergeben. Hierfür sprechen mikroskopische Untersuchungen, die der Verf. an zahlreichen Blättern angestellt hat und die ergaben, daß in roten Mesophyllzellen die Chloroplasten oft deutlich schwächer entwickelt und weniger zahlreich sind als in anthocyanfreien desselben Blattes. Es kommen sogar Fälle vor, in denen zunächst überhaupt kein Chlorophyll ausgebildet wird, eine Assimilation also unmöglich ist; Löwschin² bemerkt in seinen Chondriosomenstudien an jungen Rosenlaubblättern: »Nachdem die Bildung der Anthocyan enthaltenden Vakuolen beendet ist, beobachtet man in den betreffenden Zellen wachsende und grün werdende Chloroplasten.«

Noch viel ausgeprägter tritt diese zeitliche Trennung der Anthocyanbildung von der Chloroplastenentwicklung bei zahlreichen Pflanzen der Tropen auf. Bekanntlich entwickeln sich die Triebe vieler tropischer Bäume sehr rasch, wobei häufig noch zu einer Zeit, in der die definitive Blattgröße fast erreicht ist, die Chloroplasten nur in geringem Maß oder gar nicht ausgebildet sind; und gerade diese Blätter zeigen oft eine sehr ausgesprochene, späterhin verschwindende Rotfärbung des Mesophylls, wie sie in den Gewächshäusern Europas z. B. bei *Cinnamomum* beobachtet werden kann. Über die Verbreitung dieser Erscheinung finden sich allenthalben Angaben. So berichtet Johow³ von den kleinen Antillen: »Wie mit einem Schlag erscheint die Landschaft in rötlichem Colorit, welches durch die Farbe der jungen Triebe der Bäume hervorgerufen wird«; beschattete Teile fand Johow nur blaßrot oder

¹) Willstätter u. Stoll, Unters. über d. Assimilation der Kohlensäure. Berlin. 1918. S. 86.

²) Löwschin. Ber. d. d. bot. Ges. 1914. 32, 386.

³) Johow. Jahrb. f. wiss. Bot. 1884. 15, 281.

grünlich. Stahl¹ bemerkt, daß die jugendroten Pflanzenteile ihre höchste Ausbildung in den feuchtwarmen Strichen der Tropenländer erfahren und daß die Rotfärbung der jungen Teile besonders intensiv hervortritt, solange der Chlorophyllapparat noch mangelhaft ausgebildet ist. Anders als Johow betont er weiterhin, daß diese Färbung weder an hohe Temperatur, noch an intensive Beleuchtung geknüpft sein kann, da er sowohl in Java wie in Mexiko viele der schönsten Färbungen im dichten Waldesschatten fand und daß die Lichtschirmtheorie, die dem Anthocyan eine den Chloroplasten vor Bestrahlung schützende Funktion zuschreibt, schon deswegen nicht anwendbar ist, weil der Chlorophyllapparat noch nicht ausgebildet ist. Ähnliche Mitteilungen macht Weevers², der sich über die Funktion des Anthocyan in diesen Fällen kein Bild machen kann.

Eine künstliche Trennung der Anthocyanbildung von der Chloroplastenentwicklung läßt sich sehr leicht bei Polygonaceen erreichen. Dunkel aufgezogene Keimlinge von *Fagopyrum esculentum* werden nach Batalin³ nach 10stündiger Belichtung rot und schon 4stündige Belichtung genügt, um auch bei Wiederverdunklung Anthocyanbildung hervorzurufen. Der Verf. kultivierte die Wurzelstöcke von *Polygonum sacchalinese* 8 Wochen im Dunkeln und setzte hierauf die kräftig entwickelten gelblichen Sprosse dem Tageslicht aus: nach 2 Tagen waren die Sprosse durch und durch intensiv gerötet.

Aus alledem geht hervor, daß die Anthocyanbildung junger vegetativer Teile um so reichlicher ist, je später die Chloroplasten ausgebildet werden und ihre größte Stärke bei denjenigen Tropenpflanzen erreicht, deren Chloroplastenausbildung sich in merkwürdiger Weise verspätet. Und gerade bei einer solchen Pflanze, bei *Cinnamomum*, konnte der Verf. einen sehr hohen Flavonolgehalt nachweisen, sowohl in roten Blättern, als auch in solchen jugendlichen Blättern desselben Individuums, die bei derselben Belichtung aus nicht ersichtlichem Grunde fast rein weiß waren.

¹) Stahl. Ann. jard. bot. Buitenzorg. 1896. 13, 186.

²) Weewers. Ebenda. 1910. 3. Suppl. 1. Teil. S. 31.

³) Batalin. Acti Horti Petropolitani. 1879. 6. (Ref. Justs bot. Jahresber. 1883. 7, 1.)

Wenn also die Rotfärbung jugendlicher Blätter betrachtet werden kann als das Resultat einer Flavonolhydrierung, die durch mangelhafte Assimilationsleistung bedingt ist, so liegt es nahe, für die herbstliche Rötung die analoge Erscheinung, die Sistierung der Assimilation verantwortlich zu machen derart, daß damit eine Begünstigung der Flavonolhydrierung, bzw. eine Stabilisierung der Anthocyanstufe verbunden ist.

Die mikroskopische Untersuchung herbstlich geröteter Laubblätter ergab häufig, daß von zwei benachbarten Palisadenzellen, von denen nur die eine Anthocyan enthielt, die rot gefärbte Zelle nur noch Reste von Chloroplasten aufwies, während die anthocyanfreie, noch normal aussehende, Chloroplasten besaß. Sehr deutlich kam dies auch bei Autolyseversuchen mit Ribesblättern zum Ausdruck: wurden Reibgemische grüner und roter Blätter Ende August zwei Tage mit Thymolzusatz unter Sauerstoffabschluß gehalten, so entfärbte sich das rote Reibgemisch infolge Isomerisierung des Anthocyanins zur Pseudobase, wobei die Blattreste rein weiß wurden, während das grüne Reibgemisch seine ursprüngliche Farbe beibehalten hatte. Wenn andererseits des öfteren auch in roten Mesophyllzellen noch anscheinend intakte Chloroplasten angetroffen wurden, spricht dies noch nicht gegen die hier vorgetragene Auffassung, da ja Assimilationssistierung, besonders wenn es sich zunächst nur um teilweise Assimilationshemmung handelt, nicht eine sofortige Chloroplastendegeneration nach sich zu ziehen braucht.

Als Folge der Assimilationssistierung ist auch wohl das Auftreten einer leichten Rotfärbung in Vallisneriablättlern zu deuten, da auch hier die Rötung mit einer Chloroplastendegeneration verbunden zu sein pflegt.

An die Fälle von herbstlicher Rötung ist das Auftreten von Anthocyan in winterharten Blättern anzugliedern: Von bekannten Beispielen sei Mahonia und Hedera erwähnt, deren Mesophyllzellen die Fähigkeit der Anthocyanbildung besitzen. Die Rotfärbung bei Hedera hat Tobler¹ näher beschrieben; er findet, daß die roten Efeuarten, die alle der Form *Hedera helix* L. typica angehören, im Sommer ihr Anthocyan oft fast ganz, mehr an hellen, warmen, als an dunklen, kalten

¹) Tobler. Festschr. math. nat. Ges. Münster zur Nat.forsch. Vers. 1912.

Standorten verlieren und daß an sonnenarmem Standort schon im September eine erhöhte Anthocyanbildung einsetzt, die ihr Maximum im Dezember und Januar erreicht. Auf Grund des S. 22 mitgeteilten Flavonolgehaltes der Hederablätter läßt sich auch diese Art der Anthocyanbildung als ein durch Assimilationshemmung bedingter Hydrierungsprozeß an dem vorhandenen Flavonol auffassen.

Es ist nun die experimentell erzielbare Anthocyanbildung einer Betrachtung zu unterziehen¹. Suzuki² fand Anthocyanbildung in Hordeumkulturen bei P-Mangel; ebenso fand Czartkowski³ Anthocyanbildung bei Tradescantia, wenn Zweige in N-freier Nährlösung kultiviert wurden; bemerkenswert ist hierbei, daß die Rötung nur in den sich neu entwickelnden Blättern auftrat. Der Verf. machte ähnliche Versuche mit Zea Mays und konnte in Sandkulturen, die mit destilliertem Wasser begossen wurden, eine intensive Rötung der Blätter erzielen, die in Kontrollversuchen mit Knopscher Nährlösung nur in geringem Maß oder gar nicht auftrat. Bei den Versuchen Czartkowskis vermißt schon Czapek⁴ in einem Referat Untersuchung der Chloroplasten, da Algen bei N-Mangel ihr Chlorophyll verlieren. Es besteht tatsächlich keine Schwierigkeit, den Einfluß eines N- oder P-Entzuges auf die Anthocyanbildung als die Folge einer dadurch bedingten mangelhaften Chloroplastenausbildung zu betrachten und damit diese Faktoren dem hier maßgebenden Gesichtspunkt unterzuordnen; diese Möglichkeit war für Küster⁵ noch nicht gegeben, der die Einreihung der Befunde Suzukis und Czartkowskis in einen größeren Zusammenhang als einen noch fraglichen Punkt hinstellt.

Eine weitere stoffliche Beeinflussung der Anthocyanbildung ist ebenfalls von Czartkowski⁶ nachgewiesen, der beim Einstellen von Tradescantiazweigen in 0,05proz. Phloroglucinlösung Rötung der Blätter erzielte. In Anbetracht der Tatsache, daß

¹) Overton. Jahrb. f. wiss. Bot. 1899. 33, 171.

²) Suzuki. Zit. S. 27.

³) Czartkowski. Zit. S. 27.

⁴) Czapek. Zeitschr. f. Bot. 1915. 7, 124.

⁵) Küster. Patholog. Pflanzenanatomie. 1916. 2. Aufl. S. 370. Anmerkung.

sämtliche von Willstätter untersuchten Anthocyane einen Phloroglucinrest enthalten, ist der Gedanke einer Anthocyan-synthese in diesem Fall bestechend. Jedoch erscheint es dem Verf. wahrscheinlicher, daß auch hier eine indirekte Begünstigung der Anthocyanbildung durch Chloroplastenschädigung vorliegt, da die dargebotene Phloroglucinmenge sehr gering war und Czartkowski Rötung der Tradescantiablätter auch mit Phloridzin erzielt hat, d. h. einer Substanz, die wohl Phloroglucin enthält, jedoch in Esterbindung mit einer Säure (p-Oxyhydratropasäure) und in Glukosidbindung mit Dextrose.

Der Verf. untersuchte das Verhalten von Liliumlaubblättern beim Einstellen in eine 0,05proz. Phloroglucinlösung. Auch hier ließ sich im Licht in 3—4 Tagen tatsächlich eine Rötung erzielen; jedoch ging interessanterweise der Anthocyanbildung ein Absterben der Blattspitzen voraus. Hieraus läßt sich ohne weiteres eine gewisse Giftigkeit des Phloroglucins ersehen, die sich natürlich auch in einer Alteration des empfindlichen Assimilationsapparates äußern wird.

Die wichtigsten Versuche über experimentelle Beeinflussung der Anthocyanbildung stammen von Overton (a. a. O.); in den verschiedensten Pflanzen konnte er, wie schon erwähnt, teils bei Kultivierung, teils bei Einstellen abgeschnittener Blätter in 0,5 bis 5proz. Lösungen von Dextrose, Lävulose, Invertzucker, Rohrzucker Rötung der Blätter erzielen. Dasselbe gelang ihm bei Lilium Martagon durch Einstellen der Blätter in narkotisch wirkende Lösungen, z. B. in 8 Vol. % Äthylalkohol, ferner in Methylalkohol, Äther, Azeton u. a. Auch diese Erscheinungen lassen sich ohne weiteres als die Folge einer Assimilationshemmung betrachten. Was die Rötung durch Zuckerzufuhr betrifft, so ist durch Saposchnikoff¹, Ewart² u. a. festgestellt, daß eine Anhäufung der Assimilationsprodukte Sistierung der Assimilation zur Folge hat; andererseits ist die starke Beeinflußbarkeit der Assimilation durch Narkotika hinlänglich bekannt.

Overton hat natürlich ebenfalls das Bestreben, die Wirkung der Zuckerarten und der Narkotika unter einen Gesichtspunkt

¹) Saposchnikoff. Ber. d. d. bot. Ges. 1891. 9, 293. Ebenda. 1893. 11, 391.

²) Ewart. Journ. of the Linnean Soc. 1895. 31, 429.

zu bringen. In dem durch Zufuhr von außen in der Zelle erzeugten Zuckerüberschuß sieht er ein Material für die Anthocyansynthese gegeben und nimmt an, daß durch die Narkotika indirekt ein solcher Überschuß erzielt wird, indem diese die Zuckerableitung aus dem Blatt hemmen. Hingegen läßt sich einwenden, daß nach den Untersuchungen Warburgs¹ die Assimilation der gegen Narkotika empfindlichste Lebensvorgang ist und völlig durch Dosen gehemmt wird, die ungefähr den zwanzigsten Teil der für eine Verlangsamung der Atmung um die Hälfte nötigen Konzentration ausmachen. Eine Zuckeranreicherung in narkotisierten Blättern ist also nicht wohl denkbar, einmal wegen der Hemmung der Assimilation, zum zweiten wegen der Fortdauer des Zuckerverbrauches im nicht oder weit schwächer gehemmten Betriebstoffwechsel.

Hier ist noch eine Untersuchung von Combes² zu erwähnen, der bei einer Reihe von Pflanzen in roten Blättern einen höheren Zuckergehalt fand als in gleich alten, grünen Blättern und daraus den Schluß zog, daß zur Zeit der Rötung eine Anthocyansynthese aus Zucker vor sich geht. Auch dieser Befund ist nicht beweisend, da mit gleichem oder vielleicht größerem Recht bei dieser Synthese eine Abnahme des Ausgangsmaterials gefordert werden kann. Wenn Combes andererseits eine Vermehrung auch des Glukosidzuckers in roten Blättern feststellte, so braucht diese in Anbetracht des Vorkommens anderer, nicht flavonolischer Glukoside in der Pflanze nicht auf eine Anthocyansynthese bezogen zu werden: immerhin wäre es natürlich denkbar und die hier vorgetragenen Anschauungen nicht widerlegend, wenn etwa ein Bruchteil der vorhandenen zuckerfreien Flavonole oder Anthocyanidine in Glukoside umgewandelt würde; außerdem sind die Differenzen im Glukosidgehalt grüner und roter Blätter nach den Angaben von Combes so gering, z. B. 2,20:2,52, daß in erster Linie an die schon vorhandenen Flavonolglukoside bei der Anthocyaninentstehung gedacht werden muß.

Die indirekte Wirkung des Zuckers im Experiment läßt sich natürlich auf diejenigen in der Natur vor sich gehenden

¹) Warburg, O. *Biochem. Zeitschr.* 1919. 100, 265.

²) Combes. *Ann. scienc. nat. Bot.* 9. sér. 1909. 9, 275.

Rötungsprozesse übertragen, bei denen bis jetzt von Overton u. a. im Zuckerüberschuß ein Material für die Anthocyansynthese gesucht wird. Hierher gehört z. B. der Eintritt der Rötung nach Ringelung, Verwundung durch Insektenstiche usw., Eingriffe, die eine Stauung der abzuleitenden Kohlehydrate bedingen. Ferner ist, wie schon erwähnt, die Rötung winterharter Blätter vermutlich verursacht durch Assimilationshemmung, die ihrerseits nicht nur eine direkte Folge der Temperaturerniedrigung zu sein braucht, sondern gleichzeitig durch die von Lidforss¹ u. a. nachgewiesene Umwandlung von Stärke in Zucker bei Abkühlung bedingt sein kann. In ähnlicher Weise könnten auch bei der herbstlichen Rotfärbung mehrere Faktoren ineinandergreifen, derart, daß die Assimilation nicht nur durch Altern der Chloroplasten, sondern gleichzeitig durch eine Anreicherung an löslichen Kohlehydraten (vgl. Combes) zum Stillstand kommt.

Wenn die hier vorgetragene Ansicht über die Verwendung der Flavonole und Anthocyane bei der Assimilation zu Recht besteht, müßte es möglich sein, durch alle Mittel, die auf die Assimilation spezifisch, und zwar im Sinn einer Hemmung, einwirken, eine Rötung zu erzielen. Das einfachste derartige Mittel ist in einem möglichst vollständigen CO₂-Entzug gegeben, der natürlich infolge Vorhandenseins der Atmungskohlensäure nicht quantitativ durchgeführt werden kann, jedoch auch ohne dies in Anbetracht der gegenüber der Atmungstätigkeit zirka 20fachen Leistung des Assimilationsapparates zur Wirkung kommen muß.

Mittels CO₂-Entzuges ließ sich nun tatsächlich eine Rötung grüner Liliumlaubblätter auf folgende Weise erzielen: Eine Serie von Blättern wurde in Wasser gestellt und unter eine auf einer Glasplatte gasdicht aufsitzende Glasglocke gebracht, in der sich größere Mengen einer KOH-Lösung befanden und die mit der Außenluft durch eine Natronkalkröhre kommunizierte. Eine Kontrollserie wurde ohne CO₂-Absorbens unter eine genau gleiche Glasglocke gebracht, die oben mit Watte verschlossen war; durch beide Glocken wurde täglich CO₂-freie, bzw. gewöhnliche Luft 30 Minuten lang durchgeleitet.

¹⁾ Lidforss. Bot. Centralbl. 1896. 68, 33.

Nach fünftägigem Aufenthalt in diffusem Licht begannen die Blätter im CO_2 -freien Raum sich zu röten und waren nach zwei weiteren Tagen stark rot gefärbt, während die Kontrollblätter in dieser Zeit und darüber hinaus rein grün geblieben waren.

Wenn also S. 30 der Satz aufgestellt werden konnte, daß der Einfluß des Zuckers auf die Anthocyanbildung nur mittelbarer Art ist, so kann jetzt weiter gefolgert werden, daß in roten Frühjahrsblättern usw. die Rötung eine Folge der noch geringen Assimilationsleistung ist, während in Herbst- und Winterblättern die Hemmung der Assimilation hierfür verantwortlich gemacht werden kann. Der unter Umständen vorhandene Zuckerüberschuß der Blätter spielt dabei insofern eine Rolle, als er eines der Mittel zur Assimulationshemmung darstellt; außerdem ist der Zustand der Chloroplasten von Bedeutung, wie er im Experiment z. B. durch mangelhafte Ernährung (CO_2 -N-P-Entzug) oder durch Narikose beeinflußt werden kann.

d) Die Beteiligung der Flavonole und Anthocyane an der CO_2 -Assimilation.

Da in den vorigen Abschnitten gezeigt wurde, daß der Chemismus der Anthocyanbildung in den besprochenen Fällen offenbar in nichts anderem als in der Hydrierung der jederzeit vorhandenen Flavonole besteht, so ist die Frage zu erörtern, welches Bild sich aus allen den eben mitgeteilten Befunden von der Funktion der Anthocyane entwerfen läßt. Es erscheint dem Verf. am einfachsten, in dem Chemismus der Anthocyanentstehung, d. h. in der Genese selbst, den primären Zweck der Anthocyane und damit auch den der Flavonole zu suchen.

Schon in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß zwischen den Systemen Atmungschromogen und -pigment, Flavonol-Anthocyan eine Analogie in der Wandelbarkeit der Oxydationsstufe besteht. Diese Übereinstimmung legt es nahe, den Flavonolen und Anthocyanen im Assimilationsprozeß, von dem sie in augenfälliger Weise abhängen, die Rolle zuzuschreiben, die den Atmungschromogenen und -pigmenten bei

der Atmung zukommt, d. h. sie als vermittelnde Zwischenglieder im CO_2 -Hydrierungsprozeß aufzufassen. Hierbei ist also während der Assimilation eine ständige gegenseitige Umwandlung von Flavonol und Anthocyan anzunehmen, derart, daß in Anbetracht des Fehlens einer Rötung im normal arbeitenden Blatt das Gleichgewicht fast vollständig nach der Seite des Flavonols gerückt ist, so wie bei der Atmung das Gleichgewicht zugunsten des Atmungspigments verschoben ist. Wenn dagegen die Assimilation aus irgendeinem Grunde sistiert wird und das Blatt weiter belichtet ist, tritt eine Gleichgewichtsverschiebung nach der Anthocyanseite hin ein, sowie bei Atmungssistierung das Atmungspigment sich anhäuft. Da nun das Leben der Zelle nicht unmittelbar von der Assimilation abhängt, kann ein anthocyangerötetes Blatt an sich durchaus lebensfähig bleiben, während die Sistierung der Atmung den Tod der Zelle zur Folge hat und somit die Entstehung des Atmungspigments in sichtbaren Mengen im allgemeinen ein Zeichen des eingetretenen Todes darstellt. Eine bemerkenswerte Beziehung zwischen Atmungschromogenen und Flavonolen ist von diesem Standpunkt aus darin gegeben, daß die mit der Atmung, d. h. einem Oxydationsprozeß verkoppelten Stoffe, in ihrer hydrierten Stufe (Atmungschromogen) in der lebenden Zelle vorherrschen, während die mit der Assimilation, einem Reduktionsprozeß, hier zusammengebrachten Stoffe in ihrer dehydrierten Stufe (Flavonol) in der assimilationstüchtigen Zelle überwiegen.

Wie sich die hier angenommene Reaktionskoppelung des näheren verhalten könnte, ist zurzeit nicht zu sagen. Eine Möglichkeit ist jedoch zu erwägen, nämlich die, daß das Chlorophyll selbst hierbei, wenigstens bei der Dehydrierung des Anthocyans, beteiligt ist. Verf.¹ hat festgestellt, daß den fluoreszierenden Farbstoffen im Licht auf Grund einer Peroxydbildung eine starke Oxydationswirkung auch auf physiologisch wichtige Substanzen, die Atmungschromogene, zukommt, und hat auf Grund der tatsächlichen Fluoreszenz des Chlorophylls im lebenden Chloroplasten diesen Befund für eine Erklärung der Assimilation verwandt; es wäre nun denkbar, daß Prozesse, die mit der CO_2 -Hydrierung verkoppelt sind, wie die hier angenommene

¹) Noack, Kurt. Zeitschr. f. Bot. 1920. 12, 273.

Anthocyandehydrierung, auf der Wirkung des peroxydisch umgewandelten Chlorophylls beruht. Tatsache ist jedenfalls, daß sich chemisch reines Cyanin mittels Eosin im Licht oxydieren läßt, wie folgender Versuch zeigt: Eine wäßrige, 0,05proz. Cyaninlösung wurde unter Zusatz von Eosin im Verhältnis 1:2000 sechs Stunden lang dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt; eine ebensolche Lösung wurde während der Zeit im Dunkeln gehalten. Beide Lösungen nahmen allmählich rein eosinrote Färbung an, jedoch aus verschiedenen Gründen. Wurden sie nämlich nach sechs Stunden angesäuert, so trat in der verdunkelten Lösung sofort wieder die Cyaninfarbe auf, während dies bei der belichteten Lösung auch nach Erhitzen nicht der Fall war. In dem Kontrollversuch war also nur eine Isomerisierung des Cyanins zur farblosen Pseudobase eingetreten, während die belichtete Lösung stärker verändert worden war und zwar auf dem Weg der Oxydation; wurde nämlich die saure Lösung durch Ausschütteln mit Amylalkohol von dem Eosin befreit und erhitzt, so trat reiner gelber Farbstoff auf, der sich quantitativ in Amylalkohol überführen ließ. Kontrollen mit cyaninfreien Eosinlösungen ergaben, daß es sich hierbei nicht um Eosinreste handelt. Eine Rückhydrierung zu Anthocyan gelang auch hier so wenig wie bei dem durch H_2O_2 -Einwirkung erhaltenen Produkt (vgl. S. 13).

Jedenfalls zeigt der Versuch, daß Anthocyan durch fluoreszierende Farbstoffe im Licht oxydiert werden kann und daher eine ähnliche, jedoch reversible Beeinflussung von seiten des lebenden Chloroplasten im Bereich der Möglichkeit liegt.

e) Einwände gegen die Theorie.

Es sollen nun die Einwände besprochen werden, die sich gegen die hier entwickelten Ansichten erheben lassen. Zunächst ist hier auf die schon eingangs besprochenen, mangelhaften chemischen Grundlagen hinzuweisen: immerhin glaubt der Verf. auf Grund der von ihm gezeigten Paarung von Flavonolen und Anthocyanen gleicher Glukosidstufe eine Unterlage für seine Ansichten zu besitzen. Bei der Weiterführung der Untersuchung wäre zunächst die vielleicht methodisch nicht unzugängliche

Frage zu klären, ob z. B. bei der durch Zuckerzufuhr erzielbaren Anthocyanbildung eine Abnahme des vorhandenen Flavonols gleicher Glukosidstufe stattfindet; Herbstblätter sind hierfür wohl weniger geeignet, da vielleicht im Herbst eine Anreicherung an Flavonolen stattfindet, ohne daß jedoch hierin die direkte Ursache der Anthocyanbildung gesehen zu werden braucht, wie S. 30 betont wurde.

Ferner ist zu fragen, warum nicht bei der täglich sich wiederholenden Assimilationssistierung während der Dunkelheit eine Rötung der Blätter auftritt; dies mag einmal darin begründet sein, daß die vitale Flavonolhydrierung ein photochemischer Prozeß ist (vgl. S. 3) oder wenigstens durch Belichtung stark begünstigt wird, zum anderen darin, daß die Tätigkeit der belichteten Chloroplasten beim Ausfall ihrer wichtigsten Funktion in andere Bahnen gelenkt wird, und dadurch direkt oder indirekt eine Flavonolhydrierung im Überschuß zustande kommt.

Ein weiterer Punkt betrifft die Lokalisation des Anthocyan in den Blättern. In dieser Hinsicht bestehen natürlich keine Schwierigkeiten bei denjenigen Blättern, deren Anthocyan in den chlorophyllhaltigen Zellen enthalten ist; hierher gehört nach eigener Untersuchung und nach Literaturangaben die überwiegende Zahl der herbstlich geröteten Blätter, die das Anthocyan entweder nur im Mesophyll oder gleichzeitig, wenn auch meist in geringerem Maß, in der Epidermis führen. Ferner betont Overton, daß eine künstliche Rötung durch Zuckerzufuhr nur in den Blättern gelingt, die das Anthocyan im Mesophyll führen; eine strenge Regel scheint das jedoch nicht zu sein, da der Verf. bei mehreren Polygonumarten eine Anthocyanbildung nach Zuckerzufuhr sowohl im Mesophyll, als auch in der Epidermis feststellen konnte. Ebenso führen die jungen geröteten Blätter der Tropenpflanzen das Anthocyan offenbar durchweg im Mesophyll, wenigstens konnte der Verf. an dem reichhaltigen Material des Freiburger botanischen Gartens keinen abweichenden Befund feststellen. Anders liegen dagegen die Verhältnisse bei den roten Frühjahrsblättern der Pflanzen außertropischer Gebiete; selbst dann, wenn sie bei einer herbstlichen Rötung das Anthocyan im Mesophyll führen, kann es vorkommen, daß der Anthocyangehalt im Frühjahr sich auf die

Epidermis beschränkt oder dort in überwiegendem Maß enthalten ist. In diesem Fall ist es natürlich nicht ohne weiteres möglich, die Anthocyanbildung als eine durch die geringe Assimilationsleistung bedingte Flavonolhydrierung anzusehen; immerhin wäre es denkbar, daß die jungen interzellularenarmen Blätter eine enge physiologische Einheit darstellen und die Wirkung der geringen Assimilation sich da äußert, wo die Belichtung eine Flavonolhydrierung am meisten begünstigt; eine Anthocyanwanderung erscheint dem Verf. weniger wahrscheinlich. Es muß jedoch betont werden, daß bei einer sehr beträchtlichen Zahl auch der einheimischen Pflanzen das Anthocyan frühjahrsroter Blätter im Mesophyll enthalten ist.

Im Anschluß hieran ist das Verhalten der roten Blattvarietäten zu besprechen. Bei diesen scheint, soweit die Blätter in Betracht kommen, eine Beschränkung des Anthocyans auf die Epidermis der häufigere Fall zu sein; die Konstanz des Anthocyans ließe sich also aus der räumlichen Trennung vom Assimilationsorgan erklären. An *Coleus Verschaffelti* stellte Pick¹ folgendes hier interessierende Verhalten fest: während die jüngsten Blätter im gesamten Gewebe Anthocyan führen, beschränkt sich der Farbstoff in den nächstälteren Blättern mehr auf die Epidermis, wobei die Chromatophoren allmählich zu ergrünen beginnen. Pick vermutet, daß die »Verdrängung« des Anthocyans aus dem Mesophyll bei den meisten rotblättrigen Varietäten stattfinden dürfte. Wenn andererseits des öfteren auch in ausgewachsenen Blättern roter Spielarten Anthocyan zum Teil im Mesophyll anzutreffen ist, so liegt hierin kein Hindernis für die hier vorgetragene Anschauung, da eine Verschiebung des Flavonol-Anthocyan-Gleichgewichts aus irgendwelchen Gründen leicht denkbar ist und eine Analogie bei den Atmungspigmenten findet: Die Blütenblätter von *Vicia Faba* sind durch braunschwarze Flecken ausgezeichnet; der diese Färbung bedingende Stoff ist offenbar mit einem der Atmungspigmente identisch, die durch Einwirkung von H_2O_2 in den Zellen dieser Pflanze vital erzeugt werden können und zum Teil dieselbe Färbung besitzen; es liegt also in diesen Blütenflecken eine stabilisierte Verschiebung

¹) Pick. Bot. Centralbl. 1883. 16, 376.

des Gleichgewichts zwischen Atmungschromogen und Pigment nach der Seite des Pigments vor.

Andererseits konnte der Verf. bei mehreren weißgestreiften Blattvarietäten, die die Fähigkeit der Anthocyanbildung besitzen, z. B. bei einer Maisvarietät, feststellen, daß sich das Anthocyan vorzugsweise in den chlorophyllfreien Zonen des Blattes befindet, auch wenn es in der Epidermis lokalisiert ist.

Eine weitere Frage ist die, weshalb in zahlreichen Blättern trotz reichen Flavonolgehaltes keine Rötung im Herbst oder bei anderweitiger Assimilationssistierung zu erkennen ist; hierher gehört z. B. *Ruta graveolens*, bei der Verf. nur an wenigen Blättern im Frühjahr eine Anthocyanfärbung, und zwar in der Epidermis, feststellen konnte. Dies läßt sich wohl damit beantworten, daß bei solchen Blättern die Flavonole entweder überhaupt nicht an der Assimilation beteiligt sind, oder daß bei der Assimilationssistierung Prozesse ablaufen, die eine Flavonolhydrierung verhindern; wie mannigfaltig die beim Absterben der Blätter vor sich gehenden Stoffwechselprozesse sind, ergibt sich ja schon aus dem verschiedenen Verhalten des Chlorophylls beim Welken der einzelnen Pflanzen.

Eine wesentliche Bedeutung kommt in der Regel dem Licht bei der Anthocyanbildung zu, sei es durch direkte Beförderung der Flavonolhydrierung, sei es durch irgendwelche indirekte Einwirkung. Eine offene Frage ist die Anthocyanbildung in Organen, die dem Lichteinfluß entzogen sind (z. B. rote Rübe). Möglicherweise dienen in solchen Fällen nicht Flavonole als Ausgangsmaterial, sondern andere, noch nicht näher bekannte Stoffe; eine solche Art der Anthocyanbildung liegt, wie der Verf. früher nachgewiesen hat, bei den *Cobaea*-blüten und, wie im folgenden zu beschreiben sein wird, bei den Blüten von *Victoria regia* vor. Die vorliegende Betrachtungsweise kann also auf solche Fälle nur insofern ausgedehnt werden, als sie die Konstanz des einmal gebildeten Anthocyans in dem Fehlen des Assimilationsapparates für begründet erachtet.

f) Schlußbetrachtung.

Aus allen diesen Erscheinungen ergibt sich für die Anthocyanbildung in vegetativen Organen etwa folgende Formulierung:

In normal assimilierenden Zellen ist, abgesehen von wenigen Ausnahmefällen innerhalb der roten Blattvarietäten, keine Anthocyananreicherung durch Flavonolhydrierung möglich und zwar auf Grund der CO₂-Assimilation selbst; mit dieser scheint eine ständige Umwandlung im System Anthocyan-Flavonol verknüpft zu sein, derart, daß das Gleichgewicht fast vollständig nach der Seite der dehydrierten Stufe, d. h. des Flavonols, verschoben ist. Eine Anreicherung an Anthocyan in vegetativen Organen ist dagegen möglich in normal grünen Zellen mit gehemmter Assimilation, in Zellen zur Zeit der Chloroplastenbildung oder -zerstörung, ferner in farblosen Zellen, die mit dem Assimilationsgewebe in lockerer oder gar keiner physiologischen Verbindung stehen; hierher gehören z. B. Epidermiszellen erwachsener Blätter, Gewebepartien über Leitbündeln und auch Wurzeln, die sich im Lichte röten.

Eine enge Beziehung zwischen Anthocyanbildung und Assimilation bei Wurzeln ist von Siebert¹ tatsächlich festgestellt, aber anders gedeutet worden. Bei Belichtung einer Reihe verschiedener Wurzeln fand er eine um so stärkere Rötung, je schwächer die Ergrünung war; bei Salixwurzeln verschwand das Anthocyan beim Auftreten des Chlorophylls. Er nimmt an, daß die Anthocyanbildung auf die Chlorophyllbildung hemmend einwirkt, womit jedoch das Verschwinden des Anthocyans bei Salixwurzeln nach erfolgtem Ergrünen nicht erklärt wird.

Die hier vorgetragene Auffassung schließt natürlich nicht aus, daß dem Anthocyan in vegetativen Organen noch andere nicht in seiner Genese selbst begründete Funktionen zukommen und zwar solche, die mit dem Farbstoffcharakter in Verbindung stehen; dasselbe gilt auch für die Flavonole. Die zahlreichen Theorien, die sich mit diesem Punkt befassen, können hier übergangen werden, da in vorliegender Untersuchung weder für noch gegen sie Beweismaterial gegeben ist. Zu erwähnen ist höchstens die Beziehung, die zwischen Winterhärte und Anthocyanbildung besteht: Tobler betont z. B. (a. a. O.),

¹) Siebert. Beih. bot. Centralbl. 1920. 37, I. 208.

daß die rotblättrigen Formen am weitesten nach Norden vorgedrungen sind. In welchen Fällen wäre zu erwägen, ob nicht die Erhöhung der Kälteresistenz auf die Umwandlung von Stärke in Zucker zurückgeführt werden kann, der seinerseits die Anthocyanbildung auf Grund der dadurch bedingten Assimilationshemmung begünstigt, so daß also das Anthocyan nicht auf Grund seiner wärmeabsorbierenden Eigenschaft in Rechnung zu stellen wäre, und seine Bildung nur die mittelbare Folgeerscheinung einer anderen, die Kälteresistenz erhöhenden Reaktion darstellen würde. Bei allen Versuchen, dem Anthocyan eine Schutzfunktion bei niederen Temperaturen zuzusprechen, ist doch immer zu überlegen, daß eine derartige Rolle diesem Farbstoff nur bei Tage zukommen kann und nicht während der Nacht, d. h. in der Periode stärkster Abkühlung. Möglich wäre höchstens, daß die Wärmestrahlenabsorption des Anthocyans während des Tages eine erhöhte Assimilationsleistung und damit eine kälteresistenz erhöhende Zuckervermehrung bedingt, so daß also die durch Assimilationshemmung hervorgerufene Anthocyanbildung in gewisser Analogie zum Le Chatelierschen Prinzip eine gegenwirkende Rückwirkung auf die Assimilation zur Folge hätte. Dem steht jedoch vorderhand ein Befund von Willstätter und Stoll¹ entgegen, nach dem wenigstens bei *Acer Pseudoplatanus* kein Unterschied in der Assimilationsleistung zwischen der grünen und der rotblättrigen Rasse im Frühjahr besteht.

Auf alle Fälle wird durch die vorgetragene Auffassung eine Erklärungsmöglichkeit für den konträren Einfluß von Licht und Wärme auf die Anthocyanbildung geschaffen: Abkühlung setzt bei gleichbleibenden Lichtverhältnissen die Assimilationsleistung herab und begünstigt dadurch eine Verschiebung des Flavonol-Anthocyan-Gleichgewichts nach der Anthocyanseite, während bei Wiedererwärmung der umgekehrte Prozeß vor sich geht.

Der Verf. glaubt mit der in den letzten Abschnitten nachgewiesenen Beziehung zwischen Anthocyanbildung und Assimilation eine einheitliche Grundlage für die unter den verschiedensten

¹) Willstätter u. Stoll, Untersuchungen üb. d. Assimilation d. Kohlensäure. Berlin. 1918. S. 141.

äußeren Umständen eintretende Rückbildung vegetativer Organe geschaffen zu haben und berechtigt zu sein, die primäre Funktion der Anthocyane und mit ihnen der Flavonole in der Verkopplung mit der Kohlensäureassimilation zu suchen.

IV. Über Anthocyanbildung in Blütenblättern.

Wenn im vorhergehenden die Anthocyanbildung in Blättern auf einen einfachen Hydrierungsprozeß der jederzeit vorhandenen Flavonolstufe zurückgeführt wurde, so fragt es sich, ob diese Betrachtungsweise auch auf die Anthocyanbildung in Blütenblättern ausgedehnt werden kann. Manche Gründe sprechen dafür, daß die Anthocyanentstehung in diesem Falle anders vor sich zu gehen pflegt.

Zunächst ist zu bemerken, daß dem Licht bei der Anthocyanbildung in Blüten bei weitem nicht die wichtige Rolle zukommt wie bei Laubblättern; von den daraufhin untersuchten Blüten zeigen nur wenige ein vollständiges Ausbleiben der Anthocyanfärbung im Dunkeln, wenn auch bei mehreren eine gewisse Hemmung in der Anthocyanbildung bei Verdunklung zu konstatieren ist (vgl. Karzel¹, Fischer²). Ferner stellte Rosé³ fest, daß in den Blüten von *Cobaea* Glukosidzucker erst zur Zeit der Blaufärbung auftritt; er schließt hieraus, daß in diesen Blüten das Anthocyan aus seinen Bausteinen aufgebaut wird. Diese Untersuchungen hat der Verf. in seiner früheren Arbeit insofern ergänzend weitergeführt, als er den glukosidischen Charakter des *Cobaea*anthocyans tatsächlich feststellte und das Vorkommen von Flavonol als Anthocyanvorstufe, wie auch eine Einwanderung des Anthocyans in die Blüten verneinen konnte.

Eine weitere Begründung für die Verschiedenheit der Anthocyanbildung in Laub- und Blütenblättern sieht der Verf. darin gegeben, daß die zahlreichen gelben Blüten sich trotz ihres reichen Flavonolgehaltes nur selten in irgendeinem Entwicklungsstadium rot anfärben.

¹) Karzel. Österr. bot. Zeitschr. 1906. 56, No. 9 ff. (Ref. Justs bot. Jahresber. 35, I, 905.)

²) Fischer, Hugo. Flora. 1908. 98, 380.

³) Rosé. Compt. Rend. Acad. sc. Paris. 1914. 158, S. 955. Rev. gén. de Bot. 1914. 26, 257.

Ähnlich wie Cobacablüten stellen die Blüten von *Victoria regia* ein günstiges Objekt für Untersuchungen in dieser Hinsicht dar, da auch bei ihnen eine zeitliche Trennung zwischen Blütenentfaltung und Anthocyanbildung gegeben ist. Zunächst war bei *Victoria* die offenbar noch nicht untersuchte Beziehung zwischen Anthocyanbildung und Belichtung zu prüfen: eine rein weiße Blüte wurde morgens 10^h, kurz nach dem Aufblühen, an ihrem Standort im Gewächshaus durch Überstülpen eines tief ins Wasser reichenden Pappzylinders vollständig verdunkelt. Nach 5 Stunden waren die Blütenblätter, wie auch die morgens noch vollständig verdeckten Staubblätter, normal rot gefärbt; es ist also auch in diesem Fall die Anthocyanbildung vom Licht unabhängig. Eine Einwanderung des Farbstoffes findet ebenso wenig wie bei *Cobaea* statt, da abgeschnittene Blütenblätter, die bei 32° im Dunkeln gehalten wurden, nach 6 Stunden ebenfalls normal rot gefärbt waren.

Die chemische Untersuchung ergab folgendes: Der rote Farbstoff ist ein durch Säure spaltbares rhamnosefreies Diglukosid, dessen Sitz vornehmlich die Epidermis, in geringem Maße auch das innere Gewebe ist. Die Epidermis der weißen Blütenblätter beherbergt einen gelben Farbstoff, der jedoch keinen Flavonolcharakter besitzt, wie die Untersuchung der sauren Extrakte aus den Blütenblättern ergab: sowohl Blütenblätter in der Knospenlage, wie auch solche, die der Blüte einige Stunden nach der Blütenöffnung entnommen wurden, ergaben einen fast farblosen Extrakt; die daraus gewonnene Amylalkoholausschüttelung war nur leicht gelb gefärbt und wurde bei der Hydrierung mittels Zn und Salzsäure nur rosafarben; da sich dieser Farbton beim Erhitzen über Salzsäure nicht verstärkte, lag ein Flavonolmonoglukosid, bzw. rhamnosehaltiges Diglukosid vor und zwar nur in ganz geringen Mengen; zuckerfreies Flavonol war nicht vorhanden. Die amyalkohollösliche Komponente konnte dem sauren Extrakt durch dreimaliges Auswaschen mit Amylalkohol vollständig entzogen werden; die so behandelte wäßrige Schicht wurde beim Erhitzen mit stärkerer Schwefelsäure nicht sichtbar verändert, jedoch war die nunmehr vorgenommene Amylalkoholausschüttelung leicht gelblich gefärbt, ohne daß durch Hydrieren

und nachheriges Erhitzen eine Rötung zu erzielen war. Es konnte also keine dem Victoria-Anthocyan entsprechende Flavonolglukosidstufe nachgewiesen werden.

Anders verhielten sich die Blütenblätter nach eingetretener Anthocyanbildung, wobei sie unter denselben quantitativen Verhältnissen wie die weißen Blütenblätter zur Untersuchung kamen. Der amylalkoholische Auszug aus den stark roten Extrakten war bedeutend stärker gelb gefärbt als der aus weißen Blütenblättern, wurde bei der Hydrierung in der Kälte schön rot und dunkelte bei dem nach der Filtration vorgenommenen Erhitzen beträchtlich nach: es waren also ansehnliche Mengen eines Flavonolmonoglukosides bzw. rhamnosehaltigen Diglukosides, wie auch zuckerfreies Flavonol vorhanden. Ob gleichzeitig eine Anreicherung an rhamnosefreiem Flavonoldiglukosid stattgefunden hat, konnte wegen der mit dem vorhandenen Anthocyan übereinstimmenden Löslichkeitsverhältnisse nicht festgestellt werden (vgl. S. 18).

Um sicher zu sein, daß in den Blütenblättern nicht etwa Flavonolstufen von geringer Löslichkeit in verdünnter Säure vorhanden waren, wurden die Blätter nach der Säureextraktion mit Alkohol extrahiert und das Extrakt im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft; der Rückstand wurde mit verdünnter Säure aufgenommen, worin er sich vollständig löste. Jedoch verhielten sich die auf diese Weise gewonnenen Extrakte genau wie die oben beschriebenen und zwar bei weißen wie bei roten Blüten. Es waren also bei der direkten Extraktion mit Säure den Blättern die Flavonole nicht quantitativ entzogen worden, ohne daß jedoch eine in verdünnter Säure unlösliche, alkohol-lösliche Komponente zurückgeblieben wäre, die mit der Rotfärbung hätte in Beziehung gebracht werden müssen.

Aus diesen Befunden, die gleichmäßig an vier Blüten im Laufe des Sommers erhalten wurden, ist der Schluß zu ziehen, daß das Anthocyan der Victoriablüten nicht aus einem in der weißen Blüte vorgebildeten Flavonol auf dem Weg der Hydrierung entsteht, sondern daß das Anthocyan und die größte Menge der Flavonole gleichzeitig aus ursprünglicheren Verbindungen gebildet werden.

Welcher Art diese letztgenannten Verbindungen sind, läßt sich zur Zeit nicht sagen; immerhin ist bemerkenswert, daß sich einige Analogien zu dem Stoff nachweisen lassen, der bei den noch grünen Cobaeablüten vom Verf. angetroffen wurde. Wurden nämlich weiße Victoriablütenblätter unter Thymolzusatz der Autolyse bei Luftzutritt überlassen, so färbte sich das Autolysat intensiv olivgrün, während bei Sauerstoffabschluß die rein weiße Farbe erhalten blieb. Beim Ausschütteln der Filtrate mit Amylalkohol ging der grüne Farbstoff quantitativ in diesen über; es scheint also hier die Oxydationsstufe irgendeiner phenolischen Verbindung vorzuliegen, die sich nach Farbcharakter und Amylalkohollöslichkeit verhält wie die grüne Substanz, die aus den noch grünen Cobaeablüten direkt, d. h. ohne vorherige Oxydation bei Autolyse, gewonnen werden kann¹.

Es ist denkbar, daß es sich hier um Stoffe handelt, die zwischen den Phenylgruppen eine offene, zur Bildung eines Pyronrings fähige Molekülgruppe besitzen, also eine Umwandlung erleiden können, wie sie analog, jedoch entgegengesetzt bei der Allocyanidinbildung aus Cyanidin vor sich geht (vgl. S. 18). Im Umkreis der Flavone ist ein derartiger Stoff im Butein bekannt, das beim Erhitzen mit Säure durch Ringschluß in Butin, ein Flavanonderivat, übergeht und tatsächlich zugleich mit dem letztgenannten Stoff in den Blüten von *Butea frondosa* vorkommt.

Hier erhebt sich die Frage, ob sich aus dem beschriebenen Verhalten der Cobaea- und Victoriablüten ein allgemeinerer Gesichtspunkt für die Anthocyanbildung in Blüten gewinnen läßt. Die genannten Blüten haben das gemeinsam, daß die Anthocyanbildung bei Victoria nicht, bei Cobaea nur wenig vom Licht abhängig ist; zwar fand Fischer (a. a. O.) verdunkelte Cobaeablüten »noch am dritten Tage merklich heller gefärbt als die normalen«; jedoch ist auf keinen Fall eine vollständige Hemmung der Anthocyanbildung bei Cobaea im Dunkeln zu konstatieren, wie es die Regel darstellt bei der in Laubblättern vor sich gehenden Anthocyanbildung durch Flavonolhydrierung. Karzel fand bei Cobaea keinen Einfluß der Verdunklung auf die Farbstoffbildung. Aus diesen Tat-

¹) Vgl. Noack, Kurt. Zeitschr. f. Bot. 1918. 10, 612 ff.

sachen läßt sich die Arbeitshypothese ableiten, daß vielleicht nur bei denjenigen Blüten, bei denen das Licht einen überwiegenden Einfluß auf die Anthocyanbildung ausübt (z. B. *Syringa*¹, *Cydonia*²), der Farbstoff aus schon vorhandenem Flavonol auf dem Weg photochemischer Hydrierung entsteht, während bei den übrigen Blüten, d. h. der überwiegenden Mehrzahl, das Anthocyan aus ursprünglicheren Substanzen erst aufgebaut wird, wobei natürlich gleichzeitig ein entsprechendes Flavonol entstehen kann.

Ein gewisser Anhaltspunkt für diese Möglichkeit ist in dem Verhalten der Schaublüten von *Hydrangea paniculata* var. *grandiflora* gegeben. Bei diesen Blüten ist die Anthocyanbildung von der Blütenentwicklung zeitlich noch weiter getrennt als bei *Cobaea* und *Victoria* und ist im Gegensatz zu den beiden genannten Blüten nur im Licht möglich: Die rein weißen Schaublüten werden zur Zeit der Fruchtreife durch geotropische Stielkrümmung um 180° gedreht, so daß ihre Unterseite nach oben sieht³; hierauf färben sich die dem Licht zugekehrten Teile rot, während bei Versuchen im Dunkeln nie Rotfärbung auftrat. In diesem Fall ließ sich nun im Gegensatz zu *Victoria* und *Cobaea* lange vor dem Eintritt der Rötung, schon im Frühjahr, eine reichliche Flavonolmenge nachweisen, die zu Anthocyan hydriert werden konnte.

V. Anthocyaninspaltung mittels Tannase.

Bei seinen früheren Untersuchungen konnte der Verf. feststellen, daß der Pflanze die Fähigkeit zukommen kann, Anthocyanin fermentativ in Anthocyanidin und Zucker zu spalten; dieses Resultat wurde an roten Frühjahrsblättern von *Polygonum compactum* mittels des Autolyseverfahrens unter Sauerstoffabschluß erhalten. In weiterer Verfolgung dieser Tatsache wurde eine solche Anthocyaninspaltung noch bei einigen anderen Pflanzen, z. B. bei jungen Rosenlaubblättern, erzielt; ferner konnte bei Rutablättern auf dem Weg der Autolyse eine Spal-

¹) Karzel. a. a. O.

²) Fischer, Hugo. a. a. O.

³) Noack, Kurt. Jahrb. f. wiss. Bot. 1921. 60, 135.

tung des Flavonols, des Rutins, nachgewiesen werden; ein näheres Eingehen auf diese Versuche erübrigt sich hier.

Die Identität des in den Polygonumblättern wirksamen Ferments konnte seiner Zeit nur insoweit festgestellt werden, als Vergleichsversuche seine Verschiedenheit von Emulsin ergaben. Angesichts der von Freudenberg¹ hergestellten konstitutionellen Beziehungen zwischen den Phloroglucingerbstoffen und den Anthocyanen lag es nahe, in der Tannase das anthocyaninspaltende Ferment zu erblicken, wenn auch Freudenberg mittels Tannase weniger Glukosidbindungen als Esterbindungen gesprengt hat.

Es zeigte sich in der Tat, daß Aspergillustannase eine Reihe von Anthocyaninen in kurzer Zeit zu hydrolysieren vermag. Untersucht wurden Cyanin, das Verf. selbst rein dargestellt hat, ferner eine Anzahl weiterer Anthocyanine, für deren Überlassung der Verf. ihrem Darsteller, Herrn Geh. Rat Prof. Dr. Willstätter, zu großem Dank verpflichtet ist.

Die Tannase wurde im wesentlichen nach der von Freudenberg² angegebenen Methode hergestellt: Züchtung von Aspergillus auf Nährlösung, die Tannin und Mineralsalze enthielt; Auswaschen der Pilzernte mit Azeton; Digerieren mit Wasser und Ausfällung der Tannase mit Alkohol. Das Verfahren wurde insofern abgeändert, als der Kulturflüssigkeit ganz geringe Mengen von Zinksulfat zugesetzt wurden, um die für Tannaseausbeute ungünstige Sporenbildung zu unterdrücken; es wurden auf diese Weise rein vegetative, sehr üppige Myzelien erzielt.

Bei Vorversuchen stellte sich als lästige Begleiterscheinung das Vorhandensein einer Oxydasenkomponente in dem Tannasenpräparat heraus, wie aus folgendem hervorgeht. Wurde eine kleine Menge Tannase mit reinem Cyaninchlorid, gelöst in destilliertem Wasser, im Wasserbad bei 40° gehalten, so ließ sich schon nach einer halben Stunde auf dem Wege der Ausschüttelung mit Amylalkohol unter H₂SO₄-Zusatz eine Cyaninhydrolyse feststellen: die amylalkoholische Ausschüttelung war leicht gelb gefärbt und nahm beim Erhitzen in Gegenwart ver-

¹) Freudenberg, Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe. Berlin. 1920.

²) —, a. a. O. S. 49 und Ber. d. d. chem. Ges. 1920. S. 958.

dünnter Salzsäure eine je nach Dauer der Fermenteinwirkung mehr oder minder starke Rotfärbung an. Da während der Fermenteinwirkung die relativ schwach konzentrierte Cyaninlösung sich natürlich zur farblosen Pseudobase isomerisiert hatte, ist es verständlich, daß auch das abgespaltene Cyanidin vor dem Ansäuern und Erhitzen als Pseudobase vorlag. Andererseits bewirkte das Ansäuern des Cyanin-Tannasegemischs vor dem Ausschütteln mit Amylalkohol eine sofortige Rotfärbung, die jedoch um so geringer war, je länger die Tannaseeinwirkung angedauert hatte, d. h., je mehr von dem leicht ins Farbsalz umwandelbaren glukosidischen Farbstoff in das schwieriger zu isomerisierende Aglukon aufgespalten war. Der Farbton der mit Salzsäure erhitzten, natürlich nur das Aglukon enthaltenden Amylalkoholausschüttelung war jedoch nicht rein rot, sondern hatte einen mehr oder minder starken Stich ins Gelbliche; bei sehr lange dauernder Fermenteinwirkung resultierte überhaupt nur ein gelber Farbstoff. Es lag natürlich nahe, diesen Befund auf die Mitwirkung einer Oxydase zurückzuführen, was dadurch bewiesen werden konnte, daß Zusatz von einem Oxydasepräparat aus Kartoffelschalen oder von anorganischen Sauerstoffüberträgern das Auftreten eines gelben Spaltproduktes wesentlich beschleunigte:

Es wurden 0,05% Cyaninchlorid enthaltende wäßrige Lösungen in Mengen von je 9 ccm mit 1 ccm Tannaselösung und z. B. 0,1% MnSO_4 , 0,1% Mohrschem Salz oder Spuren von Fe_2O_3 versetzt und vier Stunden bei 40° gehalten; die Farbe der mit Salzsäure erhitzten amyalkoholischen Ausschüttelung war in keinem Falle rein rot, sondern variierte in den einzelnen Versuchen zwischen braunstichigem Rot und Gelbbraun. Ebenso wirkte ein Zusatz von $1,25 \cdot 10^{-3}$ Mol. Na_2CO_3 zu 10 ccm Cyanin-Tannase-Gemisch oxydationsfördernd ohne wesentliche Hemmung der Glukosidspaltung.

Wie empfindlich das System Cyanin-Tannase gegen Luft-sauerstoff ist, geht auch daraus hervor, daß eine weit beträchtlichere Cyanidinoxydation beobachtet wurde, wenn als Lösungsmittel Leitungswasser an Stelle von destilliertem Wasser bei den Fermentversuchen ohne Zusatz von Sauerstoffüberträgern verwandt wurde.

Die Oxydasenwirkung des Tannasepräparates konnte durch Abschluß des Luftsauerstoffs (N_2 -Atmosphäre, Paraffinöl) ausgeschaltet werden, auf einfachere Weise jedoch durch Zusatz geringer Salzsäuremengen, wodurch die Tannasenwirkung nicht, die Oxydasenwirkung dagegen vollständig, und zwar auch in Gegenwart der oben genannten Sauerstoffüberträger gehemmt wurde.

Es lag nicht in der Absicht des Verfassers, die Abhängigkeit der Tannasebildung von der Wasserstoffionenkonzentration (P_H) zu bestimmen; immerhin mußten für nachher zu besprechende Versuche optimale Aziditätsbedingungen geschaffen werden, wofür die Festlegung der Titrationsazidität hinreichend war.

Eine 0,05proz. Cyaninchloridlösung in destilliertem Wasser wurde in Mengen von je 7 ccm, die sich in gleichweiten Reagenzgläsern befanden, mit 1 ccm Tannaselösung und verschiedenen Mengen einer $\frac{n}{10}$ Salzsäure versetzt und durch Wasserzusatz auf gleiches Volumen (10 ccm) gebracht; zur Kontrolle wurde eine HCl-freie Lösung angesetzt und eine ebensolche, die jedoch zuvor 3 Minuten im kochenden Wasserbad gehalten worden war. Die HCl-Konzentrationen waren in Molen ausgedrückt folgende: 1. $2 \cdot 10^{-4}$, 2. $1 \cdot 10^{-4}$, 3. $0,5 \cdot 10^{-4}$, 4. $0,25 \cdot 10^{-4}$, 5. $0,12 \cdot 10^{-4}$, 6. $0,06 \cdot 10^{-4}$, 7. 0, 8. 0 (erhitzt). Die Röhrchen wurden 4 Stunden im Wasserbad bei 40° gehalten.

In diesem Falle war natürlich, infolge Anwesenheit freier Säure, die Isomerisation des Cyanins zur farblosen Pseudobase nach Maßgabe der H-Ionenkonzentration mehr oder weniger gehemmt, so daß noch nach 4 Stunden die Portionen mit höherem HCl-Gehalt beträchtlich rot gefärbt waren. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen mit je 3 ccm 2proz. H_2SO_4 versetzt, worauf sofort in dem Maß eine Rotfärbung bzw. Verstärkung der schon vorhandenen eintrat, als noch ungespaltenes Cyanin vorhanden war. Die einzelnen Portionen wurden nun mit je 5 ccm Amylalkohol ausgeschüttelt, der nach einmaligem Waschen mit 10proz. H_2SO_4 (zwecks Entfernung etwaiger Cyaninspuren) in den Portionen mit höherem HCl-Gehalt ebenfalls leicht rot gefärbt war; es war also auch das Cyanidin in um so größerer Menge in Form seines Farbsalzes abgespalten

worden, je höher die H-Ionenkonzentration während des Versuches lag. Die vollständige Menge des abgespaltenen Cyanidins ergab sich aber in allen Fällen natürlich erst beim Erhitzen der amylalkoholischen Lösung auf 100° in Gegenwart verdünnter Salzsäure.

Beim kolorimetrischen Vergleich der einzelnen Portionen ergab sich nun, daß $2 \cdot 10^{-4}$ Mol HCl in 10 ccm die Tannasewirkung stark hemmte, während in den übrigen mit HCl versetzten Röhrchen der größte Teil des Cyanins aufgespalten worden war derart, daß die HCl-Konzentration von $0,12 \cdot 10^{-4}$ Mol in 10 ccm das Optimum darstellte; bei der nächst niedrigeren HCl-Konzentration war, nach dem Verhalten der mit Amylalkohol ausgeschüttelten wäßrigen Schicht beurteilt, zwar der größte Teil des Cyanins gespalten worden, jedoch war der Farbton der mit HCl erhitzten Amylalkoholausschüttelung gelbstichig rot, d. h. es hatte die vorhandene Säuremenge während der Tannaseeinwirkung nicht genügt, um die Oxydasenwirkung vollkommen auszuschalten; dies war natürlich noch mehr in der HCl-freien Kontrolle der Fall, deren amylalkoholische Ausschüttelung nach dem Erhitzen mit HCl einen gelbbraunen Ton hatte. Zu bemerken ist, daß die Mengen des in Gegenwart von $1 \cdot 10^{-4}$ bis $0,12 \cdot 10^{-4}$ Mol. HCl abgespaltenen Cyanidins nicht beträchtlich verschieden waren und ein deutlicher Abstand gegen die $2 \cdot 10^{-4}$ Mol. HCl enthaltende Portion vorhanden war. In der Kontrollportion, die vor dem Versuch 3 Minuten erhitzt worden war, konnte keine Spur einer Cyaninspaltung nachgewiesen werden: Die amylalkoholische Ausschüttelung blieb beim Erhitzen mit HCl vollkommen farblos, während die angesäuerte wäßrige Schicht in einem Maße rot gefärbt war, der dem Gehalt der Stammlösung vollständig glich; die Tannase ist also durch die Siedehitze zerstört worden.

Angesichts der nicht durchführbaren Abtrennung der Oxydase von dem Tannasepräparat war es nicht möglich, unter den hier eingehaltenen Versuchsbedingungen ein genaues Optimum für die H-Ionenkonzentration anzugeben, zumal natürlich auch das ungespalten bleibende Cyanin der Oxydasenwirkung anheimfallen und daher nicht als Gradmesser benutzt werden kann; der angeführte Wert von $0,12 \cdot 10^{-4}$ Mol. HCl in 10 ccm besagt

nur, daß bei dieser Konzentration die Oxydasenwirkung ohne wesentliche Hemmung der Tannasewirkung ausgeschaltet werden kann, und wurde daher als Grundlage für die Untersuchung der Abhängigkeit der Hydrolysengeschwindigkeit von der Fermentkonzentration benutzt:

I. Zunächst wurde das theoretisch nicht einwandfreie Verfahren eingeschlagen, auf gleiche Cyaninchloridmengen verschiedene Fermentkonzentrationen gleich lange einwirken zu lassen. Der Fehler dieser Anordnung besteht darin, daß bei Fermentprozessen die Reaktionsgeschwindigkeit auch von der Menge des Substrats und seiner Spaltprodukte abhängig sein kann und sich die dadurch geschaffene Abweichung bei niederen Fermentkonzentrationen im Laufe des Versuchs nicht ausgleicht. Jedoch bedingten derartige Verhältnisse im vorliegenden Fall keine besonders starke Störung der Versuchsreihe.

Die Anordnung war folgende: 0,05 g Cyaninchlorid wurden in 80 ccm destilliertem Wasser gelöst und in 6 Reagenzgläser je 8 ccm abgefüllt; hierauf wurden je 0,12 ccm n_{10} HCl und je 1 ccm Fermentlösung in steigender Konzentration hinzugefügt und das Volum durch Wasserzusatz überall auf 10 ccm gebracht. Die einzelnen Portionen enthielten dann 0,05% Cyaninchlorid, $0,12 \cdot 10^{-4}$ Mol. HCl und Tannasepräparat in ff. Konzentrationen einer geometrischen Reihe: 1. 0,0005 %, 2. 0,0008 %, 3. 0,0012 %, 4. 0,002 %, 5. 0,0032 %, 6. 0,005 %. Die Röhrchen wurden $2\frac{1}{2}$ Stunden bei 40° im Wasserbad gehalten, hierauf mit je 3 ccm 20proz. H_2SO_4 angesäuert und mit je 5 ccm Amylalkohol ausgeschüttelt. Diese Ausschüttelungen wurden nach einmaligem Waschen mit gleichen Mengen 10proz. H_2SO_4 in Gegenwart von verdünnter Salzsäure erhitzt und die Mengen des auf diese Weise aus dem abgespaltenen Cyanidin entstandenen Farbsalzes kolorimetrisch ausgewertet. Als Standardlösung diente eine amyalkoholische Cyanidinlösung, die aus 8 ccm der Cyanin-Stammlösung nach quantitativer Säurehydrolyse und Ausschütteln mit 5 ccm Amylalkohol erhalten worden war. Der kolorimetrische Ablesefehler wurde zu ca. 8% bestimmt.

Es zeigte sich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Fermentkonzentration annähernd proportional war; wird also die Reaktionsgeschwindigkeit mit k , die Ferment-

konzentration mit F bezeichnet, so gilt die bei Fermentreaktionen häufig angetroffene Gleichung:

$$k = rF^m$$

wobei $m = 1$ ist, d. h.: $\frac{k}{F} = r$ (konst.).

Folgende Tabelle mag das Gesagte illustrieren:

Relative Fermentkonzentration	Abgespaltenes Cyanidin in mg	$\frac{k}{F} \times 10$
1	0,07	0,7
1,6	0,13	0,86
2,5	0,21	0,87
4	0,36	0,90
6,4	0,62	0,96
10	1,12	1,12

$t = 40^0$; Versuchsdauer = $2\frac{1}{2}$ Stunden.

II. Nachdem auf diese Weise ein orientierender Einblick in den Charakter der Reaktion gegeben war, wurde der korrekte Weg eingeschlagen und die Zeit bestimmt, in der aus gleichen Cyaninmengen durch verschiedene Tannasekonzentrationen dieselbe Cyanidinmenge abgespalten wird. Es wurde ein Reihenversuch in der in I beschriebenen Weise angesetzt und die Fermentreaktion durch Zusatz von je 3 ccm 20proz. H_2SO_4 unterbrochen in Zeitabständen, die sich aus der jeweiligen Fermentkonzentration auf Grund des vorhin beschriebenen Resultats berechnen ließen; unter Zugrundelegung einer Versuchsdauer von 15 Minuten für die relative Fermentkonzentrationen = 1 ergab sich die Reihe: 1. 15', 2. 23,5', 3. 37,5', 4. 60', 7. 93,7', 8. 150'. Der kolorimetrische Vergleich der abgespaltenen Cyanidinmengen ergab vollständige Übereinstimmung des Farbstoffgehalts bei sämtlichen Fermentkonzentrationen, auch nachdem die hellroten Amylalkohollösungen durch Zusatz gleicher Mengen neuen Amylalkohols noch lichtdurchlässiger gemacht wurden und damit eine größere Genauigkeit im kolometrischen Vergleich erzielt worden war.

Aus dem Gesagten geht schon hervor, daß das Auftreten einer Abbauzwischenstufe in Form eines Cyanidinmonoglukosids nicht wahrscheinlich ist; immerhin mögen noch einige, diesen

Punkt beleuchtende Tatsachen angeführt werden: Wie früher betont wurde, verteilen sich die Anthocyanmonoglukoside zwischen Amylalkohol und verdünnter Säure. Wurden jedoch die Ausschüttelungen mit Amylalkohol nach den verschiedensten Zeiten der Tannaseeinwirkung vorgenommen, so ließ sich aus ihnen, soweit sie überhaupt schon vor dem Erhitzen rot gefärbt waren, nie eine Spur des Farbstoffs in verdünnte Säure überführen; (die oben beschriebene Auswaschung der Amylalkohol-ausschüttelung mit 10proz. Schwefelsäure war eine an sich überflüssige Vorsichtsmaßregel, die darin begründet war, daß hier und da kleine Anthocyandiglukosidmengen in die amyalkoholische Ausschüttelung mechanisch mit hineingerissen werden können). In farblosen Amylalkoholauszügen aus den fermentierten Cyaninlösungen war das Vorhandensein von Monoglukosiden von selbst auszuschließen, da diese sich beim Ansäuern so rasch wie Diglukoside aus der Pseudobase ins Farbsalz rückverwandeln und die Lösungen vor der Ausschüttelung mit Amylalkohol immer angesäuert wurden. Ferner war die zweite Amylalkoholextraktion aus solchen fermentierten Lösungen, die auf Grund ihres HCl-Gehalts etwas Cyanidin-farbsalz an die erste Amylextraktion abgegeben hatten, farblos und nicht rot, wie es beim Vorhandensein eines Monoglukosids gemäß seiner Verteilungszahl zwischen Amylalkohol und verdünnter Säure zu erwarten gewesen wäre.

Eine andere Frage ist die, ob die Tannase das Cyanidinmolekül selbst anzugreifen vermag, wobei zunächst an eine Spaltung des Pyronrings zu denken wäre. Unter den gewählten Versuchsbedingungen ist dies nicht der Fall; wurde nämlich in Fermentversuchen, in denen ungefähr 25% des Cyanins noch nicht gespalten waren, die nach Entzug des Cyanidins verbleibende Farbstoffmenge mit Säure hydrolysiert und dieses Cyanidin ebenfalls in Amylalkohol übergeführt, so war die Summe der beiden Cyanidinlösungen so stark gefärbt wie eine amyalkoholische Kontrolllösung, die ausschließlich durch Säurehydrolyse aus einer gleich großen Menge der Cyaninstammlösung gewonnen worden war. Es ist also zum mindesten ein den Farbstoffcharakter vernichtender Abbau des Cyanidins ausgeschlossen und wohl auch eine Spaltung des Pyronrings

unter Bildung von Allocyanidin, da dieses im Gegensatz zu Cyanidin einen bläulichen Ton besitzt, während das auf fermentativem Wege erhaltene Spaltprodukt im Farbton mit dem durch Säurehydrolyse gewonnenen Cyanidin vollständig übereinstimmte.

Zusammenfassend läßt sich aus den bis jetzt beschriebenen Versuchen folgendes entnehmen: Der Abbau des Cyanins durch *Aspergillus*-, „Tannase“ geht bei 40° sehr rasch vor sich und besteht in einer Abspaltung der beiden Glukosemoleküle; gleichzeitig findet eine Oxydation der Farbstoffkomponente statt, die auf die Anwesenheit einer Oxydase im Tannasenpräparat zurückzuführen ist und durch Einhaltung einer gewissen H-Ionenkonzentration ohne merkliche Beeinflussung der eigentlichen Tannasewirkung ausgeschaltet werden kann. Die Reaktion zwischen Tannase und Cyanin entspricht unter der Voraussetzung, daß sie sich im homogenen System abspielt, bei den gewählten Aciditätsverhältnissen dem monomolekularen Typus.

Es war nun die Frage zu erledigen, ob die *Aspergillus*-tannase ganz allgemein die Anthocyanine aufzuspalten vermag; orientierende Versuche mit Extrakten aus verschiedenen blauen und roten Blüten, auf die weiter unten zurückzukommen sein wird, ergaben, daß dies nicht der Fall ist. Es wurden daher Versuche mit den oben erwähnten, dem Verf. von Herrn Geh. Rat. Prof. R. Willstätter überlassenen reinen Anthocyaninen angestellt, die in derselben Weise wie bei den Cyaninversuchen beschrieben, vorgenommen wurden.

Das Resultat war folgendes: Pelargonin, Malvin und Chrysanthemin werden durch Tannase fast ebenso rasch wie Cyanin gespalten; etwas langsamer geht die Spaltung des Mekocyanins, des Mohnfarbstoffes, von sich; wie das Cyanin werden auch alle die genannten Stoffe von den Oxydasenkomponenten des Tannasepräparates angegriffen, deren Wirkung auch hier durch Zusatz geringer HCl-Mengen ausgeschaltet werden konnte. Violanin, der Farbstoff des Stiefmütterchens, wurde dagegen nicht in sichtbarem Maße von Tannase angegriffen, auch nicht, wenn die Ferimenteinwirkung unter Thymolzusatz auf 40 Stunden ausgedehnt und die H-Ionen-

konzentration variiert wurde; daß der Thymolzusatz die Fermentwirkung nicht beeinträchtigt, wurde an Kontrollversuchen mit Cyanin festgestellt. Ebenso wenig wie die andern Farbstoffe konnte Violanin durch Emulsin, auch nicht nach 48stündiger Einwirkung, gespalten werden: auch die Oxydasekomponente des Tannasepräparates war anscheinend ohne Wirkung auf Violanin. Bei den Versuchen mit Violanin mußte natürlich eine kolorimetrische Vergleichung der amyalkoholischen Lösungen wie auch der wäßrigen Schichten vom Fermentversuch mit solchen von den Kontrollversuchen vorgenommen werden, da dieses Anthocyanin ein rhamnosehaltiges Glukosid ist und als solches sich zwischen Amylalkohol und verdünnter Schwefelsäure verteilt.

Es wäre denkbar gewesen, daß die Wirkungslosigkeit der Tannase gegenüber Violanin auf irgend welchen kleinsten, fermentlähmenden Beimengungen des Violaninpräparates beruht hätte, ohne daß jedoch hierdurch die allgemeine chemische Reinheit der Substanz in Frage zu stellen gewesen wäre. Dies war jedoch nicht der Fall, da reines Cyaninchlorid, das einer Violaninlösung zugesetzt wurde, in normaler Zeit durch Tannase glatt gespalten wurde. Außerdem ist zu betonen, daß die Säurehydrolyse des Violanins so rasch wie bei den anderen Anthocyaninen verläuft.

Wie schon erwähnt, wurden auch die aus zahlreichen Pflanzen gewonnenen Anthocyanine unbekannter Konstitution von Tannase zum Teil nicht angegriffen. Die betreffenden Blüten- oder Laubblätter wurden (evtl. mittels Zerreiben) kalt mit 95proz. Alkohol extrahiert, die nach CaCO_3 -Zusatz filtrierten Extrakte bei 90° eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und filtriert, worauf in der oben beschriebenen Weise unter Variieren der H-Ionenkonzentration und der Versuchsdauer das Verhalten der Farbstoffe gegen Tannase und Emulsin geprüft wurde. Hierbei erwiesen sich als nicht spaltbar, und zwar weder von Tannase noch von Emulsin die Farbstoffe der Blüten von *Viola tricolor* (mehrere Rassen), *Impatiens spec.*, *Camellia japonica*, *Begonia spec.*, *Muscari comosum*, ferner die Farbstoffe der Laubblätter roter *Coleus*- und *Begonia*rassen; leicht spaltbar war u. a. das

Anthocyaninmonoglukosid bzw. rhamnosehaltige Diglukosid der Cyclamenblüten. In sämtlichen negativen Fällen konnte das Vorhandensein fermentlähmender Begleitsubstanzen in den Organextrakten auf Grund der glatten Aufspaltung hinzugefügten reinen Cyanins ausgeschlossen werden; ferner waren sämtliche Farbstoffe durch Säure in der Hitze leicht spaltbar.

Das verschiedene Verhalten der Anthocyanine gegen Tannase gibt vielleicht ein Mittel in die Hand, um bei umfassender Vergleichung der bis jetzt von Willstätter und seinen Mitarbeitern dargestellten Anthocyanfarbstoffe einen Anhaltspunkt für Art und Ort der Zuckerbindung zu gewinnen. Auffallend ist, daß von den chemisch reinen Präparaten, die dem Verf. zur Verfügung standen, nur das Violanin nicht spaltbar war. Gerade an diesem Farbstoff haben Willstätter und Weil¹ festgestellt, daß die beiden im Molekül enthaltenen Zuckerarten, Glukose und Rhamnose, nicht in einfachem Verhältnis zu einander stehen, wie es sonst bei den (diglukosidischen) Anthocyaninen der Fall ist, sondern daß hier in Analogie mit zahlreichen Fällen in der Quercitrinreihe noch nicht geklärte, verwickeltere Beziehungen zwischen Aglukon und Zucker herrschen. Damit ist nicht gesagt, daß die Tannaseresistenz der Farbstoffe, die der Verf. mittels Alkohol aus Pflanzenteilen extrahierte, auf dieselbe Ursache zurückzuführen wäre; in diesem Falle könnte eine, die Fermentwirkung hemmende Bindung der Farbstoffe an andere Substanzen vorliegen, die bei der angewandten primitiven Extraktionsmethode nicht gesprengt worden ist; so fanden Willstätter und Mieg² den Blütenfarbstoff von *Delphinium Consolida*, das Delphinin, an 2 Mol. p-Oxybenzoësäure gebunden, die beim Kochen mit Salzsäure zugleich mit 2 Mol. Glukose abgespalten werden konnten.

Auf Grund der nahen Verwandtschaft von Anthocyanen und Flavonolen war zu erwarten, daß die Aspergillustannase auch Flavonolglukoside zu spalten vermag. Der Verf. prüfte die Wirkung seines Tannasepräparats gegenüber Quercitrin und verwandte zum Nachweis der Spaltung die im Kap. III, 2 beschriebene Tatsache, daß Flavonolglukoside in

¹) Willstätter und Weil. Liebigs Ann. 1916. 412, 180.

²) Willstätter und Mieg. Liebigs Ann. 1914—1915. 408, 63.

amylalkoholischer Lösung sich direkt zu Anthocyan hydrieren lassen, während die zuckerfreien Flavonole hierbei zunächst (farblose) Anthocyanidinpseudobasen liefern, die erst beim Erhitzen mit Säure ins rote Farbsalz übergehen:

Eine wäßrige Quercitrinlösung wurde, wie bei den Fermentversuchen an Anthocyanen beschrieben wurde, mit Tannase und HCl versetzt und 8 Std. bei 40° gehalten. Hierauf wurde die Lösung zusammen mit dem inzwischen entstandenen Quercetin-niederschlag mit Amylalkohol ausgeschüttelt und der amylalkoholische Auszug in der Kälte hydriert, wobei die Lösung farblos blieb; als danach die Lösung filtriert und erhitzt wurde, nahm sie eine schön rote Färbung an. In Kontrollversuchen wurde die Quercitrin-Tannaselösung zunächst 3 Min. im kochenden Wasserbad gehalten und dann 8 Std. bei 40° sich selbst überlassen; in diesem Fall färbte sich der aus der niederschlagsfreien Lösung gewonnene Amylalkoholauszug schon während des Hydrierens in der Kälte schön rot. Hieraus geht hervor, daß Tannase aus Quercitrin den Zucker abzuspalten vermag, wobei das Aglukon, das Quercetin, intakt bleibt.

Die Untersuchung wurde nicht auf weitere chemisch reine Flavonole ausgedehnt; es ist jedoch zu vermuten, daß auch andere Flavonolglukoside durch Tannase gespalten werden können. So konnte in Extrakten aus Blättern von *Ruta graveolens* ein flavonolisches Aglukon abgespalten werden in einer Menge, die auf das in diesen Blättern reichlich vorkommende Rutin bezogen werden mußte.

Die Aspergillustannase hat also nicht nur die Fähigkeit, Esterbindungen zu spalten, sondern vermag auch Glukosidverbindungen zu lösen; sie stellt demnach offenbar ein Fermentgemisch dar, worauf auch Freudenberg¹ hinweist, da schon Pottevin² außer Phenylsalicylat und Fetten auch phenolische Glukoside (Arbutin) mittels Aspergillustannase gespalten hat. Sigmund³ berichtet über eine fermentative Spaltung des Aesculins und macht hierfür ein spezifisches Ferment, »Aesculase«, verantwortlich; in Anbetracht der vielseitigen Wirkung der

¹) Freudenberg. *Chemie d. nat. Gerbstoffe*. Berlin. 1920. S. 50.

²) Pottevin. *Compt. rend. Acad. des Sc.* 1901. **132**, 706.

³) Sigmund. *Monatshefte d. Chemie*. 1910. **31**, 657.

„Tannase“ dürfte nicht nur die Aesculase mit Tannase identisch sein, sondern wohl auch eine Reihe ähnlicher Enzyme wie Populase, Salicase usw.

Der Abbaufähigkeit, wenigstens einer Reihe von Anthocyan- und Flavonolglukosiden durch Tannase kommt sicher eine physiologische Bedeutung zu. Dies ergibt sich aus den früher erwähnten Autolyseversuchen des Verf.s an einer Reihe geröteter Frühjahrs-Laubblätter, bei denen eine fermentative Anthocyaninspaltung nachgewiesen werden konnte. Allgemeines über diesen Punkt kann natürlich erst festgestellt werden, wenn eingehende Untersuchungen über die Verbreitung der Tannase und die etwaige Abhängigkeit ihres Vorkommens von gewissen Entwicklungszuständen der Pflanze vorliegen. Soviel läßt sich jedoch wohl jetzt schon entnehmen, daß den Anthocyan- und Flavonolglukosiden auch auf Grund ihres Zuckergehalts eine Bedeutung im Stoffwechsel zukommen wird. Dies war ja bislang der leitende Gesichtspunkt der Autoren, die sich mit der Stoffwechsel-Physiologie der Glukoside befaßten, derart, daß die aglukonischen Komponenten mehr oder weniger als Konservatoren des allein als wichtig erachteten Zuckers angesprochen wurden. In den vorhergehenden Abschnitten glaubt der Verf. jedoch hinlänglich eine lebhaftete Teilnahme der Aglukonkomponenten am Stoffwechsel gezeigt zu haben, soweit Anthocyane und Flavonole in Betracht kommen. Immerhin war es wünschenswert auch eine Verwendung der Anthocyanine als Zuckerquellen direkt nachzuweisen.

Solche Versuche lassen sich begreiflicherweise an höheren Pflanzen nur unvollkommen erledigen; es wurde daher untersucht, ob Anthocyanin, das Hefekulturen als einzige Zuckerquelle geboten wurde, eine Abspaltung des Zuckers erleidet. Folgende Kulturen wurden angesetzt:

1. 20 ccm 10proz. Glukoselösung + 2 g Preßhefe + 0,01 g Cyaninchlorid,
2. 20 ccm Wasser + 2 g Preßhefe + 0,01 g Cyaninchlorid,
3. 20 ccm 10proz. Glukoselösung + 2 g Preßhefe.

Die Kulturen wurden 17 Stunden bei 39° gehalten, wobei Kultur 1 und 3 gleichstarke Gärung zeigte; hierauf wurde mit

je 3 ccm 20proz. Schwefelsäure angesäuert und filtriert. Das Filtrat von Kultur 1 hatte denselben Farbgehalt, wie eine hefe-freie Kontrollösung; das Filtrat von Glas 2 war deutlich heller gefärbt. Der hierauf hergestellte amylalkoholische Auszug aus Filtrat 1 war gelb gefärbt und wurde beim Erhitzen über HCl nur leicht rosarot, während der amylalkoholische Auszug aus Filtrat 2 blaßrot gefärbt war und beim Erhitzen über HCl schön hellrote Farbe annahm. Die amylalkoholische Ausschüttelung des Filtrates 3 war wie beim Filtrat 1 gelb gefärbt, woraus erhellt, daß die Gelbfärbung des amylalkoholischen Auszugs 1 nicht auf einer Cyaninoxidation beruhte, sondern seinen Grund im normalen Stoffwechsel der Hefe haben muß.

Hieraus geht hervor, daß Hefe bei Abwesenheit von Zucker Cyanin zu spalten vermag, während bei Zuckergegenwart eine derartige Einwirkung auf Cyanin nur in Spuren stattfindet; Anthocyanin kann also als Zuckerquelle verwandt werden. Wie bei *Aspergillus* wird auch hier die Tannase nur im Bedarfsfall in größerer Menge gebildet.

Dieser Befund stellt nebenbei eine indirekte Bestätigung der früher bezweifelte, erst von Biddle und Kelley¹ exakt festgestellten Tatsache dar, daß die Hefe bei der Tanningärung beteiligt ist.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß das Verschwinden der Anthocyanine in vegetativen Organen auf verschiedene Weise vor sich gehen kann; Dehydrierung zu Flavonol, Aufspaltung in Cyanidin und Zucker, oder Aufspaltung des entstandenen Flavonols. Ob diese Prozesse in allen Pflanzen stattfinden und wie sie bejahendenfalls ineinandergreifen, ist Sache weiterer Untersuchung. Der negative Ausfall der Mehrzahl der Autolyseversuche, die der Verf. im Laufe der Jahre vorgenommen hat, wie auch die Wirkungslosigkeit der Tannase gegenüber zahlreichen Anthocyaninen scheint jedenfalls nicht generell für ein Verschwinden des Farbstoffs auf dem Weg der Hydrolyse zu sprechen. Hierbei muß noch betont werden, daß eine Entfärbung anthocyanhaltiger Organe noch auf andere Weise er-

¹) Biddle und Kelley. Journ. of the Amer. Chem. Soc. 1912. 34, 919.

folgen kann, so durch Isomerisierung des Farbsalzes zur Pseudobase, wie sie Willstätter bei der Kornblume und der Verf. (a. a. O.) an mehreren andern Pflanzen nachweisen konnte.

In diesem Zusammenhang mag das Verhalten junger geröteter Ilexblätter erwähnt werden. Trotz starken Farbgehalts des intakten Blattes erscheinen Blattquerschnitte, die zur mikroskopischen Untersuchung angefertigt werden, oft fast anthocyanfrei; erst auf Zusatz von 10 proz. Schwefelsäure tritt eine Rötung des Chlorophylls, besonders der Pallissadenzellen ein. Es scheint also hier durch den Wundreiz eine Verminderung der H-Ionenkonzentration eingetreten zu sein, die eine Isomerisierung des Farbstoffs zur Pseudobase zur Folge hatte, Verhältnisse wie sie der Verf. früher (a. a. O.) für die von Fitting¹⁾ beobachtete Ausbleichung erwärmter *Erodium*blüten in Anspruch genommen hatte.

VI. Die Beziehung zwischen Anthocyanen und Gerbstoffen.

Bekanntlich wurde von jeher zwischen Anthocyanen und Gerbstoffen eine enge Beziehung angenommen, die sich im Zeitalter mikroskopisch-chemischer Untersuchung dahin präzierte, daß die Anthocyane aus Gerbstoffen, wenigstens aus einem Teil der eisengrünenden, entstehen sollten. Hierbei wurde jedoch, wie der Verf. schon früher (a. a. O.) hervorhob, die Existenz der eisengrünenden Flavonole nicht berücksichtigt, d. h. der Substanzen, die nichts anderes als die dehydrierte Stufe der Anthocyane darstellen. Immerhin mußte auch der Verf. auf Grund der von ihm nachgewiesenen Umwandlungsfähigkeit des Cyanidins in eine gerbstoffrotähnliche Substanz einen Zusammenhang zwischen Anthocyanen und Gerbstoffen annehmen und kam zur Vermutung, daß Anthocyane, bzw. Flavonole, und Gerbstoffe aus denselben Bausteinen entstehen. Die Untersuchungen Freudenberg's (a. a. O.) haben nun neuerdings gezeigt, daß zwischen der Anthocyan-Flavonol-Gruppe und einer bestimmten Gerbstoffgruppe, den Phloroglucingerbstoffen, eine konstitutionelle Verwandtschaft besteht. Und gerade diese Gerbstoffgruppe ist es, in der bei der Erhitzung mit Säuren eine

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

Gerbstoffrotbildung angetroffen wird. Diese Rotbildung schreibt Freudenberg einer Kondensation der Phloroglucinkerne unter Wasseraustritt zu.

Die gerbstoffrotähnliche Substanz, die der Verf. aus Cyanin erhalten hatte, war mittels Erhitzen in Gegenwart geringer Formaldehydmengen und HCl gewonnen worden. In seiner früheren Arbeit ließ der Verf. die Frage nach dem Chemismus der Reaktion offen, steht jetzt aber nicht an, den Prozeß als eine Kondensation zu betrachten, wie sie ja häufig durch Formaldehyd realisiert werden kann. Mit der Bildung der »Rote« aus Gerbstoffen stimmt diese Reaktion auch insofern überein, als die kondensierte Substanz um so schwerer löslich wird, je länger die Erhitzung dauert; gleichzeitig verliert sich der Indikatorcharakter des ursprünglichen Anthocyans immer mehr. Folgende Versuchsreihe mag dies illustrieren; je 10 ccm einer 0,05 proz. Cyaninchloridlösung wurden in verdünnter Salzsäure unter Zusatz von 0,5 ccm einer 30proz. Formalinlösung verschieden lange auf 100° erhitzt und die schon in den ersten 20 Minuten beginnende Ausfällung wie folgt untersucht:

Erhitzungs- dauer	Farbe:		Verhalten des Niederschlags gegen		
	der Lösung	der Ausfällung	Äthylalkohol	Amylalkohol	Soda
2 Stunden	blaßviolett	dunkelrot	leicht löslich	schwer löslich	blaue Lösung
3 1/2 „	kaum gefärbt	„	löslich	unlöslich	„ „
8 „	rotstichig-gelb	grauschwarz	unlöslich	„	graublaue Lösung mit Rückstand
16 „	gelb	„	„	„	graublaue Lösung viel Rückstand

Bemerkenswert ist vor allem die graublaue Färbung, die die höheren Kondensationsstufen auf Sodazusatz annehmen, da diese, wie Verf. feststellte, sehr häufig mit Niederschlägen erhalten wird, die aus gerbstoffhaltigen Pflanzenextrakten gewonnen worden sind. Andererseits können aus anthocyanfreien Pflanzenteilen durch Erhitzen mit Salzsäure schwer lösliche rote Stoffe gewonnen werden, die noch Indikatorcharakter nach Art der Anthocyane zeigen. Eine derartige Substanz hat der Verf. in seiner früheren Arbeit aus den Kapselwänden von Aesculus auf Grund einer Angabe Rochleders erhalten und näher charakterisieren können und

konnte neuerdings feststellen, daß die Laubblätter zahlreicher Anthurium-Arten einen ähnlichen Stoff in großer Menge in seiner farblosen, d. h. nicht kondensierten Form enthalten. Die Gattung Anthurium führt Dekker¹⁾ in seiner Gerbstoffmonographie nicht als gerbstoffhaltig an; jedoch ergaben Versuche des Verf., daß die wässrigen Extrakte aus den Bättern Leimfällung geben. Auf alle Fälle enthalten sie eine in saurer Lösung fast farblose Substanz, die beim Erhitzen mit H_2SO_4 oder HCl in einigen Minuten tief rot wird und schließlich in roten Flocken ausfällt. Diese sind in Aethyl- und Amylalkohol leicht löslich. Die amyalkoholische Lösung wird beim Auswaschen der Säuren mit Na-Acetat violett und gibt an Soda-lösung die Substanz unter vorübergehend schön blauer Färbung ab, die dann in eine Mißfarbe übergeht; es liegt daher wohl eine Mehrheit von Stoffen vor. Nach Ansäuern wird der rote Farbstoff wiederhergestellt und kann wieder in Amylalkohol überführt werden. Die neutrale aethylalkoholische Lösung liefert mit Pb-Acetat violette Flocken, mit $FeCl_3$ schwarzviolette Färbung. Außerdem enthalten die Blätter ein glukosidisches Flavonol und in der Jugend Anthocyanin. Die farblose Substanz scheint entweder eine Anthocyanidinpseudobase oder zum mindesten ein den Anthocyanen nahestehender Gerbstoff zu sein. Infolge ihres reichlichen Auftretens und ihrer sicher nicht schwierigen Reindarstellung mag sie ein günstiges Objekt für chemische Untersuchung abgeben.

Eine Ähnlichkeit zwischen Gerbstoffroten und Anthocyanen besteht auch insofern, als die Stammsubstanzen der Gerbstoffrote sich gegenüber Amylalkohol häufig wie die Anthocyane verhalten. So liefern z. B. die sauren Extrakte aus Epimedium-laubblättern einen amyalkoholischen Auszug, der beim Erhitzen mit HCl intensiv rot wird; mittels dreier weiterer Amylalkohol-ausschüttelungen läßt sich diese Farbstoffvorstufe der wässrigen Schicht vollständig entziehen. Wird nun die auf diese Weise gewaschene wässrige Schicht mit HCl erhitzt, so tritt in kurzem eine rote Fällung auf, die quantitativ unter Lösung in Amylalkohol übergeht. Es liegt nahe, die Unterschiede dieser beiden Farbstoffvorstufen auf Verschiedenheiten im

¹⁾ Dekker. Die Gerbstoffe. Berlin. 1913.

Glukosidcharakter und auf Abspaltung des Zuckers im zweiten Fall zurückzuführen, so daß also die farblosen Vorstufen als Verwandte der Anthocyanine in Form der Pseudobasen anzusehen wären; der Unterschied gegenüber den Anthocyanen liegt darin, daß die Isomerisierung dieser Glukoside im Gegensatz zu den Anthocyaninen erst beim Erhitzen erfolgt. Interessant ist nun, daß schon Willstätter und Nolan¹ bei der Reindarstellung des Cyanins aus Rosen auf eine glukosidische Farbstoffvorstufe gestoßen sind, die sich erst bei längerem Stehenlassen in Säuregegenwart zum Farbstoff umwandelt; sie vermuten, daß es sich hierbei um ein noch unbekanntes, schwieriges, isomerisiertes Anthocyanin handelt. (Vgl. hierzu auch Noack, a. a. O. S. 583.)

»Gerbstoffrote« sind bislang wohl nur als Bestandteile toter Gewebe (Rinde u. a.) bekannt, wobei es sich allerdings wohl nicht um Rote, wie sie im vorigen beschrieben wurde, handeln dürfte. Der Verfasser vermutet nun, in der Blattstielbasis von *Angiopteris evecta* einen genuinen Farbstoff gefunden zu haben, der eine gewisse Ähnlichkeit mit den Farbstoffen besitzt, die er beim Erhitzen gerbstoffhaltiger saurer Pflanzenextrakte erhalten hat: Diese Blattstielbasen enthalten ein parenchymatisches Grundgewebe, in dem zahllose Zellen mit intensiv roten Vakuolen verteilt sind und die dem ganzen Gewebe auf der Schnittfläche ein fleischfarbenes Aussehen verleihen. Trotzdem ist der aus dem Gewebe gewonnene schwefelsaure Extrakt nur leicht gelblich gefärbt; er gibt diesen Stoff an Amylalkohol ab, der dann beim Erhitzen über HCl blaßrot wird. Der rote Farbstoff ist also im Gegensatz zu den Anthocyanen nicht mit verdünnter Säure extrahierbar; er läßt sich jedoch leicht mit heißem Äthylalkohol extrahieren. Die so erhaltene Lösung wird beim Alkalisieren mit Soda grau-blau und auf Säurezusatz wieder rot. Wird die alkoholische Lösung bei Zimmertemperatur eingedampft, so hinterbleibt ein roter Rückstand, der weder in heißem Methyl-, Äthyl- oder Amylalkohol noch in heißem Aceton löslich ist.

Zusammenfassend läßt sich wohl aus dem gesagten der Schluß ziehen, daß eine bestimmte Gruppe von Gerbstoffroten

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

eine Brücke zwischen den Anthocyanen und den Phloroglucingerbstoffen darstellt in dem Sinne, daß diese beiden Stoffgruppen in Kondensationsprodukte mit ähnlichen Eigenschaften überführt werden können. Ob diese chemische Betrachtungsweise auch auf die Physiologie dieser Substanzen übertragen werden darf, ist eine Frage, die erst durch weitere Vorarbeiten im Gebiet der Gerbstoffchemie erledigt werden kann. Immerhin möchte der Verf. im Gegensatz zu seiner früheren Ansicht die Möglichkeit einer Umwandlung von bestimmten Gerbstoffen in Anthocyane, bzw. Flavonole und auch vielleicht die Möglichkeit des umgekehrten Prozesses nicht in Abrede stellen.

In diesem Zusammenhang mag eine Vermutung Tschirchs¹ erwähnt werden, nach der das Aurantiamarin, der kolloidale Bitterstoff der Bitterorange durch Umlagerung oder Polymerisation aus dem daselbst vorkommenden, den Flavonolen nahestehenden, Hesperidin entstehen würde, einer kristallisierenden Substanz, die mit Aurantiamarin isomer ist. Freudenberg² betont andererseits, daß das Verhalten des Hesperidins gegen Säuren an Rotbildung erinnert.

VII. Zusammenfassung.

I. Über die Funktion der Anthocyane und Flavonole in grünen Organen.

1. Der Verf. ging von der Ansicht aus, daß die Rolle der Anthocyane in grünen Organen ganz allgemein auf biochemischem Wege, d. h. auf Grund ihrer Entstehung aus Flavonolen erklärt werden kann. Anthocyane und Flavonole unterscheiden sich nach den Untersuchungen Willstätters nur in der Oxydationsstufe derart, daß zu jedem Flavonol ein bestimmtes Anthocyan als hydrierte Stufe gehören muß. Derartige Stoffpaare, die sich nur in der Oxydationsstufe unterscheiden, spielen im Pflanzenreich offenbar eine große Rolle; physiologisch am besten bekannt sind bis jetzt die mit dem Atmungsprozeß verkoppelten »Atmungschromogene« mit den zugehörigen Pigmenten. Es war daher der Schluß berechtigt, daß auch dem System Flavonol-Anthocyan eine Rolle im Stoffwechsel zufällt.

¹) Tschirch. Handb. d. Pharmakognosie. Leipzig. 1917. II, 2. S. 862.

²) Freudenberg. Chemie d. natürl. Gerbstoffe. Berlin. 1920. S. 42.

Ehe jedoch auf diese Funktion näher eingegangen werden konnte, war es nötig, Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, daß in vegetativen Organen mit der Fähigkeit der Anthocyanbildung jederzeit ein Flavonol vorhanden ist, das in seiner Konstitution mit dem Anthocyan des betreffenden Organes übereinstimmt. Diese Frage konnte wenigstens insoweit erledigt werden, als sich eine Übereinstimmung im Glukosidcharakter des betreffenden Anthocyans mit einem der in Mehrzahl vorhandenen Flavonole desselben Organs nachweisen ließ und auch die dauernde Anwesenheit dieses Flavonols festgestellt werden konnte; die Frage nach der Übereinstimmung der Aglukone mußte dagegen offen bleiben.

Da die Glukosidnatur zahlreicher Flavonole noch unvollständig erforscht ist, mußte zunächst ein Weg gesucht werden, um auf einfache Weise den Glukosidcharakter eines bestimmten Flavonols zu bestimmen. Für die Anthocyane hat Willstätter gezeigt, daß diese sich je nach ihrer Löslichkeit im Amylalkohol gruppieren lassen in 1. rhamnosefreie Diglukoside, 2. rhamnosehaltige Diglukoside und Monoglukoside, 3. Aglukone.

Der Verfasser konnte nun feststellen, daß die verschiedenen Flavonole die in einem und demselben Organ vorzukommen pflegen, in Amylalkohol eine ganz verschiedene Löslichkeit besitzen, so daß in Anbetracht der nahen Verwandtschaft der Flavonole mit den Anthocyanen aus diesem Verhalten auf eine Übereinstimmung in Glukosidcharakter eines Flavonols mit einem Anthocyan gleicher Amylalkohollöslichkeit geschlossen werden kann.

Ein weiteres Hilfsmittel der Unterscheidung war in der noch nicht bekannten Tatsache gegeben, daß glukosidische Flavonole, in amyalkoholischer Lösung bei Zimmertemperatur hydriert, sofort in Anthocyanfarbsalze übergehen, während zuckerfreie Flavonole hierbei zunächst zu einer farblosen Anthocyanidinpseudobase hydriert werden, die erst bei nachfolgendem Erhitzen ins (rote) Farbsalz übergeht. Dies stimmt mit der gegenüber den glukosidischen Anthocyanen schwierigeren Isomerisierbarkeit der zuckerfreien Anthocyane überein, wie sie Willstätter regelmäßig beobachtet hat.

Mittelst dieser Methoden ließ sich nun zunächst feststellen,

daß in den Pflanzen das Vorkommen rhamnosefreier Flavonoldiglukoside weit verbreitet ist, was um so mehr zu betonen ist, als die bekannten Flavonole allermeist Monoglukoside oder rhamnosehaltige Diglukoside darstellen, soweit sie nicht als Aglukone vorliegen. Diese Tatsache ist für den vorliegenden Zweck deshalb von Bedeutung, weil die Anthocyane in den Pflanzen überaus häufig als rhamnosefreie Diglukoside gegeben sind. Ferner ergab sich, daß ganz allgemein in grünen Organen mit der Fähigkeit der Anthocyanbildung jederzeit ein Flavonol angetroffen werden kann, das in seiner Glukosidstufe mit dem Anthocyan des betreffenden Organs übereinstimmt.

Es ist demnach wohl, auch ohne Kenntnis des Aglukoncharakters, der Schluß berechtigt, daß die in grünen Organen vorhandenen Flavonole auf dem Weg der Hydrierung in die entsprechenden Anthocyane übergehen können, zumal der Verf. in einer früheren Arbeit eine derartige Hydrierung bei der Autolyse von jungen Paeoniasproßachsen im O_2 -freien Raum festgestellt hat und eine solche auch als vitalen Prozeß bei *Polygonum compactum* nachweisen konnte.

2. Die zahlreichen, in der Literatur erwähnten Faktoren, die eine Anthocyanbildung in grünen Organen bedingen, lassen sich unter einen Gesichtspunkt bringen, wenn sie nicht unmittelbar mit der Anthocyanbildung in Beziehung gebracht werden, sondern nur zunächst ihre Wirkung auf den Chlorophyllapparat in Erwägung gezogen wird. Hierbei ergibt sich, daß diesen sämtlichen Faktoren eine assimilationshemmende bzw. chloroplastenschädigende Wirkung zukommt, dies gilt z. B. von der Einwirkung narkotischer Mittel, von Temperaturerniedrigung, N- und P-Entzug usw. Besonders ist hier noch die Anthocyanbildung nach Überschwemmung des Assimilationsgewebes mit Zucker zu erwähnen, da Overton hierbei eine Anthocyan synthese aus dem gebotenen Zucker annimmt. Auch für diesen Fall konnte jedoch der Verf. nachweisen, daß die Wirkung des Zuckerüberschusses in einer durch die Gleichgewichtsstörung bedingten Hemmung der Assimilation gemäß den Befunden von Ewart u. a. beruht: Mit Glukose überschwemmte *Lilium*laubblätter, die unter diesen Umständen im Licht Anthocyan bilden, enthalten, wenn sie kurz vor der

Rötung untersucht werden, nicht mehr Flavonol als frische Kontrollblätter, die davon ganz bedeutende Mengen enthalten; außerdem ist der Flavonolgehalt der im Dunkeln mit Zucker überschwemmten Blätter nicht größer als der frischer Blätter.

Einen exakten Beweis für diese Ansicht sieht der Verf. in der von ihm festgestellten Tatsache gegeben, daß *Lilium*-laubblätter, deren Assimilation lediglich durch CO_2 -Entzug behindert wird, sich im Lichte ebenfalls rot färben.

Es liegt auf der Hand, die an der intakten Pflanze auftretende Rötung ebenfalls auf eine im Verhältnis zur vorhandenen Belichtung unter dem Normalwert liegende Assimilationsleistung zurückzuführen, soweit die roten Blattvarietäten ausgeschlossen werden und die im Frühjahr und Herbst eintretende Rötung in Frage kommt. Dies drückt sich oft unmittelbar im Mikroskop darin aus, daß das Verschwinden der Rötung im Frühjahr mit der Fertigstellung der Chloroplasten, die Entstehung der Rötung im Herbst mit deren Degeneration zusammenfällt. Besonders ausdrucksvoll ist diese Erscheinung bei der Blattentwicklung zahlreicher tropischer Gewächse, bei denen die Chloroplastenausbildung sehr spät einsetzt und die eine intensive Rotfärbung aufweisen, so lange die Assimilationsleistung noch gering ist. Daß auch in diesem Falle in jedem Entwicklungsstadium der Blätter Flavonole vom Glukosidcharakter des betreffenden Anthocyans vorhanden sind, konnte der Verf. an *Cinnamomum* feststellen.

3. Aus den in den beiden vorigen Abschnitten beschriebenen Tatsachen läßt sich nun betreffs der Funktion der Flavonole und Anthocyane folgender Schluß ziehen:

In normal assimilierenden Zellen ist, abgesehen von wenigen Ausnahmefällen innerhalb der roten Blattvarietäten, keine Anthocyananreicherung auf dem Wege der Hydrierung der jederzeit vorhandenen Flavonole möglich und zwar auf Grund der CO_2 -Assimilation selbst; mit dieser scheint eine ständige Umwandlung im System Anthocyan-Flavonol verkoppelt zu sein, derart, daß das Gleichgewicht fast vollständig nach der Seite der dehydrierten Stufe, d. h. des Flavonols

verschoben ist. Eine Anreicherung an Anthocyan ist dagegen möglich in normal grünen Zellen mit gehemmter Assimilation, in Zellen zur Zeit der Chloroplastenausbildung oder -zerstörung, ferner in Zellen, die mit dem Assimilationsgewebe in lockerer oder gar keiner Beziehung stehen, z. B. in den Epidermiszellen erwachsener Blätter, die bei roten Blattvarietäten den hauptsächlichlichen Sitz des Anthocyans darstellen, ferner in Gewebepartien über Gefäßbündeln usw.

Damit wird also dem System Flavonol-Anthocyan in dem Reduktionsprozeß der CO_2 -Assimilation eine Funktion zugesprochen, wie sie für das System Atmungschromogen-Pigment bei dem Oxydationsprozeß der Zuckerveratmung auf Grund der Untersuchungen von Heinr. Wieland als erwiesen angesehen werden kann.

Diese Auffassung schließt natürlich nicht aus, daß dem Anthocyan in vegetativen Organen noch andere, nicht in seiner Genese selbst begründete Funktionen zukommen können.

II. Anthocyanbildung in Blütenblättern.

Die Untersuchung der Blüten von *Victoria regia* ergab, daß die plötzlich eintretende Rötung der Blüten auch im Dunkeln in normaler Weise erfolgt, und daß dieser Prozeß nicht auf der Hydrierung schon vorhandener Flavonole beruht, da diese erst gleichzeitig mit dem Anthocyan in größerer Menge entstehen. Ein ähnliches Verhalten fand der Verf. früher bei den Blüten von *Cobaea scandens*, deren Anthocyanbildung ebenfalls im Dunkeln vor sich gehen kann. Vermutlich entsteht das Anthocyan in diesen Fällen aus ursprünglicheren Verbindungen. Jedoch sprechen einige an Hydrangeablüten gewonnene Anhaltspunkte für die Möglichkeit, daß bei solchen Blüten, deren Anthocyanausbildung nur im Licht vor sich geht, ebenfalls die Hydrierung eines schon vorhandenen Flavonols vorliegt.

III. Die Zuckerabspaltung aus Anthocyanen und Flavonolen durch Tannase.

Die Anthocyanine werden von Emulsin nicht angegriffen; wohl aber läßt sich eine Reihe dieser Farbstoffe durch Asper-

gillustannase in Aglukon (Anthocyanidin) und Zucker spalten. Als leicht spaltbar erwiesen sich folgende chemisch reine Anthocyanfarbstoffe: Cyanin, Pelargonin, Malvin, Chrysanthemin; etwas schwerer ist Mekocyanin, der Mohnfarbstoff, spaltbar. Nicht spaltbar ist Violanin; da dieser Farbstoff anormale Verhältnisse in seiner Bindung an Zucker aufweist, scheint der Unterschied an der Spaltbarkeit der verschiedenen Anthocyane von Art und Ort der Zuckerbindung abzuhängen.

Bei der Einwirkung der Tannase auf die spaltbaren Farbstoffe machte sich die Wirkung einer Oxydasenkomponente auf den cyklischen Bestandteil geltend, die durch Zusatz geringer HCl-Mengen ausgeschaltet werden konnte.

Die quantitative Durcharbeitung der Tannasewirkung auf Cyanin ergab unter den gewählten Versuchsbedingungen und unter der Voraussetzung, daß die Reaktion im homogenen System verläuft, das Vorliegen einer monomolekularen Reaktion.

Auch Flavonole können durch Tannase gespalten werden; untersucht wurde das Quercitrin und der rutinhaltige Extrakt der Blätter von *Ruta graveolens*.

Hefe besitzt in Abwesenheit von Zucker die Fähigkeit der Anthocyaninspaltung.

IV. Die Beziehungen zwischen Anthocyanen und Gerbstoffen.

Cyanidinchlorid läßt sich durch Erhitzen mit HCl und wenig Formaldehyd zu einer Substanz kondensieren, die ihrem allgemeinen Verhalten nach große Ähnlichkeit mit Substanzen besitzt, die der Verf. als »Gerbstoffrote« aus anthocyaninfreien, gerbstoffhaltigen Pflanzenextrakten gewinnen konnte. Mit diesen stimmt das Kondensationsprodukt aus Cyanidin vor allem in einer Abschwächung des Indikatorcharakters überein.

So läßt sich u. a. aus *Anthurium*blättern ein „Gerbstoffrot“ gewinnen, das mit Soda eine schöne blaue Färbung annimmt.

Es scheint also, wenigstens vom chemischen Standpunkt aus, ein Teil der Gerbstoffrote eine Brücke zwischen den Anthocyanen und den Phloroglucingerbstoffen darzustellen.

Bonn, Botan. Inst. d. Universität. Juni 1921.

