

Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside.

Fortsetzung.

von

T h. W E E V E R S.

Im Jahre 1903 erschien in den Jahrbüchern für Wissenschaftliche Botanik von meiner Hand eine Arbeit über die physiologische Bedeutung einiger Glykoside. Die Untersuchung wurde angestellt mit *Salix species* ins besondere *Salix purpurea* L. und mit *Aesculus Hippocastanum* L., und es zeigte sich, dass sowohl das Salicin wie die Glykoside der Rosskastaniensamen als Reservestoffe zu betrachten sind; ersteres wird beim Austreiben der Knospen konsumiert, letztere verschwinden während der Keimung.

Beim Austreiben der *Salix purpurea* L. erscheint Saligenin, was auf eine Spaltung des Salicins, welche dem Verbrauch vorangeht, hindeutet; die Quantität ist jedoch so klein, dass ein anderer Stoff das endgültige, aromatische Spaltungsprodukt des Salicins sein muss und als solches betrachtete ich das Catechol. Dieser Phenolkörper kommt in allen Teilen der *Salix purpurea* vor und wie quantitative Untersuchungen ergaben, verhalten sich die Mengen Salicins und Catechols im entgegengesetzten Sinne; wenn das Salicin abnimmt, so nimmt das Catechol zu und umgekehrt; in einigen Fällen verhalten sich beide Veränderungen wie die Molekulargewichte. Durfte ich daher nicht sagen, dass das Catechol, nach der Spaltung des Salicins und Abgabe der daraus entstandenen Glukose an weiter

gelegenen Zellen, in jeder Zelle lokalisiert bleibt und wieder neu zugeführte Glukose zu neuem Salicin bindet, also Pfeffers Hypothese bestätigt, dass die Verbindungen der Benzolderivate mit Kohlenhydraten zur Bildung schwer diosmierender Stoffe dienen; casu quo das Catechol aus dem Transportstoff Glukose den nicht diosmierenden, transitorischen Reservestoff Salicin bildet? Es war jedoch wünschenswert durch weitere Untersuchungen die Richtigkeit obenstehender Hypothese zu prüfen und auch mit anderen Objekten zu arbeiten, überdies mehrere Fragen zu lösen, die sich bei der Arbeit mit *Salix purpurea* aufgeworfen hatten. So blieb zum Beispiel die Bedeutung des Populins, eines Glykosids, das in *Populus* und ebenfalls in mehreren *Salix* Arten vorkommt noch völlig unbekannt und gelang es mir damals nicht ein Enzym aus *Salix purpurea* zu isolieren, das eine Spaltung des Salicins hervorrufen konnte, obschon mehrere Beobachtungen auf das Vorhandensein eines derartigen Enzyms hinwiesen.

Ich habe daher meine Untersuchungen fortgesetzt, aber mit andern Arbeiten beschäftigt, konnte ich die Resultate leider nicht so schnell veröffentlichen, als ich gewünscht hatte.

Hydrochinon-Glykoside.

In mehreren Genera der Ericaceae kommen Arbutin und Methylarbutin neben einander vor. Zuerst wurden sie von Kavalier¹⁾ entdeckt in den Blättern von *Arctostaphylos uva ursi* Spr. Später wurde es in *Chimophila umbellata* Nutt.²⁾, *Vaccinium Vitis idaea* L.³⁾, *Gaultheria procumbens* Salisb. und *Epigaea repens* L.⁴⁾, *Arctostaphylos glauca* Lindley⁵⁾

1) Kavalier, Lieb. Ann. der Pharm. und Chem. 82.

2) C. Zwinger und Himmelmann, Liebig, Ann. 129.

3) E. Claassen, Am. Journ. of Pharm. XLII. 1870.

4) J. Oxley, " " " " XLIV. 1872.

5) J. H. Flint, " " " " XLV. 1873.

nachgewiesen und ebenfalls in *Pyrola species*¹⁾, *Rhododendron maximum* L., *Kalmia angustifolia* L., *Calluna vulgaris* L., *Ledum palustre* L.

Jedoch fehlen sie auch in vielen Species, z. B. gelang mir in *Vaccinium Myrtillus* L. und *Erica Tetralix* L. der Nachweis nicht.

Beide Glykoside erhält man aus dem Gewebe durch wiederholtes Extrahieren mit heissem Wasser. Der Extrakt wird mit Bleiacetat versetzt, dessen Uebermass durch Schwefelwasserstoff entfernt wird. Beim Einengen der Flüssigkeit kristallisieren beide Glykoside aus in langen, farblosen Nadeln. Schmelzpunkt Arbutin 160°—170°. Von Methylarbutin 142°.

Arbutin ist schwer löslich in kaltem Wasser und Aether, leicht löslich in Alkohol und heissem Wasser; Methylarbutin ist in kaltem Wasser besser löslich. Beide reduzieren die Fehlingsche Lösung nicht.

Von verdünnten Säuren werden beide Stoffe gespalten; das Arbutin in Hydrochinon und Glukose, das Methylarbutin in Methylhydrochinon und Glukose.

Die Anwesenheit des Arbutins ist nicht so leicht nachzuweisen, weil die Blaufärbung in wässriger Lösung mit FeCl₃ nicht sehr charakteristisch ist und die Reaktion von Jungmann Blaufärbung durch Phosphormolybdänsäure in alkalischer Lösung ebenfalls durch Hydrochinon verursacht wird. Am besten erkennt man daher die Glykoside, nach vorhergehender Spaltung, mittels Säuren, an ihren aromatischen Spaltungsprodukten, dem Hydrochinon und Methylhydrochinon, wofür mehrere zuverlässige Reaktionen vorliegen.

In vielen dieser Objecte wird von einigen Autoren ebenfalls das Vorkommen freien Hydrochinons erwähnt²⁾ und

1) E. Smith, Am. Journ. of Pharm. 1881.

2) O. Hesse, Lieb. Ann. Bd. 290. 1896, fand in den Blüten der *Protea mellifera* 2—5 % Hydrochinon.

das war gerade der Umstand, der mich veranlasste die arbutinhaltigen Pflanzen in Untersuchung zu nehmen, weil er gute Erwartungen gab, dass man hier die Hypothese Pfeffers über die Bedeutung der Benzolderivate für den Stoffwechsel prüfen konnte.

Hydrochinon (Paradioxybenzol) und Methylhydrochinon sind gut löslich in Wasser, Alkohol und Aether und bilden keine Niederschläge mit Bleiacetat; sie sind also am besten aus den Pflanzenteilen zu erhalten, wenn man diese auszieht mit heissem Wasser, den Extrakt einengt und mit Aether ausschüttelt. Der Aetherextrakt wird abdestilliert und der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen, mit einigen Tropfen Bleiacetat versetzt und abfiltriert. Das Filtrat wird dann aufs Neue mit Aether ausgeschüttelt und den Aetherrückstand bilden die fast farblosen Krystalle des Hydrochinons und Methylhydrochinons. Beide Phenolkörper sind mittelst Benzol leicht zu trennen, weil Hydrochinon darin praktisch unlöslich ist, Methylhydrochinon jedoch sehr gut löslich.

Zur Identifizierung des Hydrochinons wurde der Aetherrückstand sublimiert, und am meisten die Reaktion mit Kaliumnitrit und Essigsäure benutzt, wodurch es zum Chinhydron oxydiert wird. Das Chinhydron bildet braune bis schwarze, in auffallendem Lichte grünlich metallglänzende Prismen; sie polarisieren stark mit gerader Auslöschung und haben einen starken Dichroismus; in durchgehendem Lichte schwarz bis schokolade-braun, in reflektiertem Licht schwarz bis grün ¹⁾. Ebenfalls benutzte ich die Reaktion mit Naphtochinon, schöne Dendrite und rhombische Tafeln, welche prächtigen Dichroismus von blassgelb zu blutrot zeigen ²⁾.

1) H. Behrens, Mikrochemische Analyse organischer Verbindungen. Heft I, S. 23.

2) Idem, Heft I, S. 48.

Das Methylhydrochinon gibt mit FeCl_3 kein Chinhydron.

Für meine physiologischen Untersuchungen waren quantitative Bestimmungen des Hydrochinons und Arbutins (Methylhydrochinon und Methylarbutin) eine unerlässliche Bedingung und es war deshalb notwendig eine derartige Bestimmungsmethode auszuarbeiten.

Auf Vorschlag Prof. N. Schoorl's benutzte ich die Eigenschaft des Hydrochinons und Methylhydrochinons die Fehlingsche Lösung zu reduzieren. Die Schoorlsche Glukose Bestimmung¹⁾, wobei das nicht reduzierte Quantum Kupfersulfat durch eine Jodtitration bestimmt wird, war hier unbrauchbar; die Grenze ist absolut unscharf, sogar wenn die Bestimmung in einer Kohlensäureatmosphäre vorgenommen wird. Das Verfahren von Allihn mit Asbestfiltrerröhrchen leistete jedoch vorzügliche Dienste.

Ausgehend von abgewogenen Mengen reinen Hydrochinons stellte ich nachstehende Tabelle her. Die Flüssigkeit wurde 2 Minuten gekocht, dann heiss filtriert.

4 mg. gefundenen Kupfers entsprechen					1.4 m. Hydrochinon.	
16	"	"	"	"	2.8	" "
20	"	"	"	"	5.6	" "
24	"	"	"	"	8.3	" "
32	"	"	"	"	11.0	" "
40	"	"	"	"	13.7	" "
48	"	"	"	"	16.5	" "
57	"	"	"	"	19.4	" "
66	"	"	"	"	22.2	" "
75	"	"	"	"	25	" "
84	"	"	"	"	27.8	" "
95	"	"	"	"	30.5	" "
104	"	"	"	"	33.3	" "
114	"	"	"	"	36.1	" "

1) N. Schoorl. Ned. Tijdschrift der Pharmacie, 1899.

Durch Interpolation wurde dann aus der gefundenen Menge Kupfer die entsprechende Quantität Hydrochinon berechnet.

Wenn die Hydrochinonmenge sehr klein war, sodass das Allihnverfahren untauglich schien, so wurde die Bestimmung in derselben Weise, wie in der ersten Abhandlung für das Catechol dargelegt wurde, vorgenommen. 25 mg. Hydrochinon wurden in 25 cc. absoluten Alkohols gelöst und eine bestimmte Quantität z. B. 0.05 cc. oder 0.1 cc. bis zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand sublimiert mittels des erwärmten kupfernen Täfelchens mit einer runden Öffnung. In dieser Weise verdampft der Alkohol ohne hinwegzufließen. Um den Tropfen legt man einen Ring von Asbestpapier und sobald der Alkohol verdampft ist, darauf ein Objektglas mit einem Tropfen Wasser. An der Unterseite der Tropfens erhält man einen gleichmässigen Beschlag.

Ebenfalls löst man die unbekannte, aus den Pflanzenteilen isolierte Menge Hydrochinon in Alkohol, macht derartige Beschläge und verdünnt die Flüssigkeit so lange, oder nimmt eine kleinere Quantität bis die Beschläge genau ebenso gross sind. Wenn man dann weiss, wieviel von beiden Flüssigkeiten zur Sublimation benutzt worden ist, kann man leicht berechnen wie gross die gesuchte Quantität Hydrochinon ist. Diese Methode liefert besonders bei kleinen Quantitäten sehr vorzügliche Resultate.

Was das Arbutin betrifft, so konnte die Bestimmung in zweifacher Weise geschehen, entweder das aromatische Spaltungsprodukt oder die Glukose konnte zur Bestimmung benutzt werden. Die Spaltung durch verdünnte Säuren war jedoch bei weitem besser als die durch Emulsin, wie mehrere Versuche zeigten. Das käufliche Emulsin (Merck) spaltete das Arbutin sehr unvollkommen, obschon das Präparat vorzüglich war und zum Beispiel Salicin schnell zerlegte.

100 mg. Arbutin 2×24 Stunden bei 30° mit 25 mg. Emulsin. 40 % gespalten.

100 mg. Arbutin 4×24 Stunden bei 30° mit 25 mg. Emulsin. 80 % gespalten.

Wenn ich jedoch selbst Rohemulsin bereitete, indem Mandeln fein zerrieben, mit Wasser gemischt, abfiltriert und das Filtrat mit Alkohol versetzt wurde, so war der Alkoholniederschlag im Stande das Arbutin schnell zu spalten; in 48 Stunden bei 30° C. 99 %.

Die Bestimmung des Arbutins mittels Emulsinspaltung bot also Schwierigkeiten, mittels Säurespaltung war es nur möglich die aromatische Hälfte des Arbutins zur Bestimmung zu verwenden, denn es konnten in den Pflanzen noch sehr gut andere Körper vorliegen z. B. Saccharose, oder andere Glykoside, die ebenfalls nur nach Spaltung die Fehlingsche Lösung reduzierten.

Das Verfahren war also folgendes:

Die Pflanzenteile wurden getötet durch kochendes Wasser, das schwach angesäuert war (mittels eines Tropfens verdünnter Salzsäure), damit keine Zersetzung des Hydrochinons auftrate und dreimal mit heissem Wasser ausgezogen. Der Extrakt wurde eingeengt, mit Bleiacetat versetzt, dessen Uebermass durch Dinatriumphosphat gänzlich entfernt wurde und das Filtrat auf Volum gebracht. Die Flüssigkeit wurde drei Mal mit dem halben Volum Aether ausgeschüttelt, dann enthielt das Aetherextrakt quantitativ das Hydrochinon und Methylhydrochinon.

Von der wässerigen Lösung wurde der Aether auf dem Wasserbade entfernt und die Flüssigkeit mit verdünnter Salzsäure eine Stunde am Rückflusskühler gekocht, wieder auf Volum gebracht und fünf Mal mit dem halben Volum Aether ausgeschüttelt. Der Aetherrückstand enthielt das durch Spaltung des Arbutins (Methylarbutins) gebildete Hydrochinon (Methylhydrochinon).

Zwei Hydrochinonbestimmungen genügten also zur Bestimmung des Hydrochinons und des Arbutins. Das Objekt, das eine genügende Quantität Arbutin enthielt und über welches ich am leichtesten verfügen konnte war *Vaccinium Vitis idaea* L.; dieses habe ich daher zu nachstehenden Versuchen benutzt.

Zuerst musste untersucht werden ob die Behauptung, dass freies Hydrochinon hier vorliege, wirklich zutreffe, oder ob das Hydrochinon durch Spaltung des Arbutins während des Absterbens sich bilde. Dazu wurde das Töten der Teile in verschiedener Weise vorgenommen und ebenfalls die Verarbeitung des Materials, um zu sehen ob das Resultat sich ändere.

Jedesmal wurden $\pm$ 2500 Blätter benutzt, deren berechnetes Trockengewicht 30 gr. war.

- 1°. Die Blätter wurden ziemlich langsam in Wasser getötet, der Extrakt wurde nach 14 Tagen verarbeitet. 60 mg. Hydrochinon = 0,20 %.
- 2°. Die Blätter wurden schnell in kochendem Wasser getötet und der Extrakt sofort im Dunkel verarbeitet 8 mg. Hydrochinon.
- 3°. Methode wie Sub 2. October 1907 1 mg. Hydrochinon.
- 4°. Die Blätter wurden getötet in kochendem Alkohol von 96 %, 2 $\times$ mit Alkohol extrahiert, der Alkohol abgedampft und der Extrakt wie oben behandelt, kein Hydrochinon (November 1907).

Im Herbst kommt also kein freies Hydrochinon in den Blättern von *Vaccinium Vitis idaea* vor.¹⁾

Obenstehendes deutet also erstens darauf, dass Spaltung des Arbutins sehr leicht auftritt und dass die Extrahierung

1) Kanger's Beobachtung. (Arch. exp. Path. Bd. L. 1903) dass im Spätherbst die Blätter einen Maximal Arbutin und Hydrochinongehalt besitzen, ist unrichtig.

mit der nötigen Vorsicht stattfinden muss; zweitens nötigte es mich zu untersuchen ob vielleicht auch ein Enzym vorhanden wäre, dass die Spaltung zu Stande bringen könnte.

Junge, angefeuchtete Teile wurden im Mörser fein zerrieben, der Brei koliert und der Extrakt mit Alkohol versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und gab eine Lösung welche die Fehlingsche Lösung nicht reduzierte und kein Hydrochinon enthielt. Wenn dieser Lösung jedoch 50 mg. Arbutin (das, wie oben gesagt nicht Fehling reduziert) hinzugefügt wurde, so enthielt die Flüssigkeit nach 24 Stunden deutlich Hydrochinon und Glukose, das Arbutin war also durch das aus den jungen Teilen bereitete Rohenzym gespalten.

Obenstehende Bestimmungstabelle hat nur Gültigkeit für reines Hydrochinon, ich musste daher prüfen ob in *Vaccinium Vitis idaea* nebst Arbutin auch viel Methylarbutin vorhanden sei, wäre dies der Fall so würde die Bestimmung ungenau sein, weil die Tabelle für Methylhydrochinon nur annähernd gelten kann. Aus den Blättern erhielt ich z.B. einen Aetherrückstand von 255 mg.; die Benzol-extrahierung ergab 12 mg., welche als Methylhydrochinon zu betrachten sind, also 4,7 %. Die Mehrzahl ist bei weitem Arbutin und darauf sind denn auch die weiteren Berechnungen basiert. Die Blätter enthalten bei weitem die grösste Menge Arbutin, jedoch sind die individuellen Schwankungen des Gehaltes sehr gross, sodass man mit einer grossen Anzahl Pflanzen arbeiten muss, am liebsten von *einem* Ort, weil Schattenpflanzen oft viel weniger Arbutin enthalten.

Zum Beispiel enthielten einige Pflanzen unweit Amersfoort November 1907, 1,15 % Arbutin, andere Pflanzen unweit Soesterberg November 1907 2,31 % Arbutin, gerade das Doppelte.

Die Pflanze hat solche kleinen Blätter, dass diese nicht

zu Halbierungsversuchen geeignet sind; Versuche über eventuelle Schwankungen im Gehalt während Tag und Nacht konnte ich also nicht anstellen und musste ich mich begnügen mit einigen Beobachtungen im Frühjahr während des Austreibens der jungen Schösslinge. Die Rolle, welche das Glykosid beim Assimilationsprozess spielt, konnte ich bei diesem Objekte also nicht erforschen.

23 November 1908. 1200 Blätter, frisch 27 g. Trockengewicht 11,85 g.

Hydrochinon abwesend.

Arbutin 274 mg. = 2,31 %.

Glukose ¹⁾ 455 mg. = 3,84 %.

Die Zweige, welche diese Blätter trugen (Trockengewicht 6,4 g.) enthielten Spuren Arbutins. Glukose 94 mg.

3 Mai 1909. Gerade vor dem Austreiben der jungen Schösslinge wurden am selben Schattenort wie oben, wieder gesammelt 1200 Blätter,

frisch 30 g. trocken 15 g.

Hydrochinon 1 mg.

Arbutin 445 mg. 2,97 %.

Glukose 375 mg. = 2,50 %.

24 Mai 1909. Nach dem Austreiben, vom selben Orte, 1200 Blätter, frisch 29,5 g. trocken 14 g.

Hydrochinon 3 mg.

Arbutin 292 mg. 2,09 %.

100 junge, aus diesen Pflanzen ausgetriebene Schösslinge trocken 5.7 g.

Hydrochinon 3 mg.

Arbutin 53 mg. 0,93 %.

1) Wenn der Extrakt mit Salzsäure gekocht und mit Aether ausgeschüttelt war, bestimmte ich die Total-Glukose. Nach Abzug der vom Arbutin herrührenden Glukose erhielt ich obenstehenden Wert. Dieser Wert umfasst also alle nach Säurespaltung anwesende Glukose mit Ausnahme der Arbutinglukose.

Blätter und Schösslinge zusammen also 24 Mai.

Hydrochinon	6 mg.
Arbutin	345 mg.
Glukose	117 mg.

Das Hydrochinon hatte um 5 mg. zugenommen, das Arbutin 100 mg. abgenommen.

Ein zweiter Versuch stellte ich an mit Pflanzen von einem hellen, sonnigen Orte.

8 Mai 1909. 1200 Blätter, frisch 29 g. trocken 14,8 g.

Hydrochinon abwesend.

Arbutin	750 mg. 5,07%.
Glukose	324 mg. = 2,19%.

26 Mai 1909. 1200 Blätter, frisch 29 g. trocken 12,9 g.

Hydrochinon	4 mg.
Arbutin	405 mg. 3,15 %.
Glukose	161 mg. = 1,25%.

120 junge Schösslinge,

Hydrochinon	3 mg.
Arbutin	104 mg.
Glukose	129 mg.

Blätter und Schösslinge zusammen 26 Mai.

Hydrochinon	7 mg.
Arbutin	509 mg.
Glukose	291 mg.

Hier hat also das Hydrochinon um 7 mg. zugenommen, das Arbutin um 241 mg. abgenommen.

Wir können aus diesen Versuchen schliessen, dass das Arbutin als ein Reservestoff zu betrachten ist, der beim Austreiben der jungen Schösslinge gespalten und zum Teil konsumiert wird, 22% und 32% des Totals ist verschwunden; die Abnahme in den alten Blättern ist 34%.

und 46%. Die Zunahme des Hydrochinons ist jedoch viel kleiner, als wir erwarten dürften, wenn der aromatische Teil des Arbutins nach der Spaltung völlig aufgespeichert bliebe und nicht weiter in den Stoffwechsel einbezogen wurde. Jedoch ist diese Bildung des Hydrochinons einen deutlichen Hinweis auf die Arbutinspaltung welche vom obenerwähnten Enzym, das aus den jungen Teilen erhalten worden ist, hervorgerufen wird. Während des Austreibens sind nur Spuren Arbutin im Stengel zu finden, also ein anderer Beleg dafür, dass nicht das Arbutin qua talis sondern sein Spaltungsprodukt, die Glukose transportiert wird.

Oft beobachtete ich, dass die Pflanzen im September zum zweiten Male austrieben, dann war kein Hydrochinon oder nur Spuren desselben in den jungen Teilen zu finden, der Benzolkörper scheint bei der kräftigen Assimilation sofort weiter verarbeitet zu werden.¹⁾

Ciamician G. und G. Ravenna²⁾ haben Saligenin, Hydrochinon, Arbutin und Salicin in das Pflanzengewebe (Mais, Gartenbohne) eingepflanzt. Die Glykoside wurden besser ertragen als die aromatischen Bestandteile, erstere wurden hydrolysiert oder verbraucht; die Benzolderivate verblieben zum Teil unzersetzt, zum Teil wurden sie in eine durch Emulsin spaltbare Verbindung, wahrscheinlich also in die diesbezüglichen Glykoside, übergeführt.

1) Czapek (Biochemie der Pflanzen) hat auf das gleichzeitige Vorkommen von Chinasäure in den Ericaceae gewiesen, welche Chinasäure bei Oxydation Hydrochinon liefert. Vielleicht hat man darin nach seiner Meinung einen Hinweis auf die Genese des Hydrochinons und deshalb des Arbutins zu erblicken. Die von mir aus *Vaccinium Vitis idaea* erhaltene Oxydase bildet jedoch aus Chinasäure kein Hydrochinon, lediglich zersetzt sie das Hydrochinon selbst.

2) Ciamician G. und G. Ravenna. Mem. d'Accad. d'Istit. di Bologna. Refer. Bot. Centralbl.

Gerade wie ich es für Gaultherin ¹⁾, den Reservestoff von *Gaultheria procumbens* L. klargelegt habe und Leclerc du Sablon ²⁾ es für die Kohlenhydratreserven anderer immergrüner Pflanzen gezeigt hat, nimmt auch beim *Vaccinium* *Vitis idaea* das Arbutin während des Winters langsam zu, um beim Austreiben im Frühjahr zum Teil verbraucht zu werden.

Im Jahre 1904 wurde von G. Rivière und G. Bailhache ³⁾ im März in den Knospen des Birnbaumes Hydrochinon gefunden; aus 1 KG. isolierten sie 3 bis 5 g.

Es schien mir erwünscht auch dieses Objekt für meine physiologischen Versuche zu benutzen, weil es mehrere Vorteile bot: die Blätter sind zur Halbierung geeignet und so viele sind an einem Exemplar vorhanden, dass sie zu mehreren Versuchen ausreichen, sodass individuelle Schwankungen im Gehalt keine Schwierigkeiten liefern können. Ausser bei Versuchen wie die obigen im Frühjahr, konnte *Pirus communis* also auch verwendet werden beim Studium der Assimilation, ob der Hydrochinongehalt sich während des Tages ändere.

Zuerst war es notwendig zu wissen, ob auch hier ein hydrochinonlieferndes Glykosid vorlag oder nicht. Ersteres zeigte sich schon bald; wenn die Birnblätter in kochendem Wasser getötet wurden und der wässrige Extrakt mit Bleiacetat und Dinatriumphosphat behandelt war, so wurde mit Aether wiederholt ausgeschüttelt, bis das Hydrochinon völlig entfernt war. Wenn nun die wässrige

1) Weevers. Th. Onderzoekingen over glukosiden in verband met de stofwisseling der plant. Diss. Amsterdam 1902.

2) Leclerc du Sablon. Sur les réserves hydrocarbonées des arbres à feuilles persistantes. C. R. Acad. Sc. Paris 1905.

3) G. Rivière et G. Bailhache. De la présence de l'hydroquinone dans le poirier. C. R. de l'Acad. de Sc. Paris 1904.

Lösung mit Salzsäure gekocht wurde, so war nach einer Stunde eine sehr grosse Quantität Hydrochinon vorhanden, die nur von der Spaltung eines Glykosides herrühren konnte. Leider gelang es mir nicht das Glykosid zu isolieren, sodass ich nicht prüfen konnte, ob hier wirklich Arbutin vorliege oder nicht.

Ich verfügte über 2000 Birnblätter, tötete sie in kochendem Wasser, engte den Extrakt ein und versetzte es mit Bleiacetat, dessen Übermass durch Schwefelwasserstoff entfernt wurde. Beim Einengen der Flüssigkeit erhielt ich keinen kristallinischen Niederschlag, die Masse wurde syrupartig. ¹⁾ Dennoch war eine genügende Menge des Glykosides vorhanden, was sich beim Kochen mit Salzsäure zeigte, denn dabei erhielt ich ± 1 g. Hydrochinon auf Arbutin berechnet, also 2,7 g.; das Auskristallisieren wird dem Anschein nach von Nebenprodukten gehemmt.

Das Glykosid, das ich vorläufig als Arbutin betrachten möchte, wird durch Emulsin sehr schwierig gespalten, noch schwieriger wie oben für das *Vaccinium*-Arbutin erwähnt wurde. Dies erinnert an die Beobachtungen Treub's, ²⁾ der gezeigt hat, dass Emulsin mehrere blausäureliefernde Glykoside nur sehr unvollkommen spaltet. Aus den Blättern isolierte ich in derselben Weise wie bei *Vaccinium Vitis idaea* ein Enzym, welches das Arbutin spaltet in Glukose und Hydrochinon, auch hier muss also das Töten der Pflanzenteile sehr schnell vorgenommen werden, am besten mittels kochenden Alkohols, sonst wird das Glykosid schnell gespalten, daher kommt es wahrscheinlich, dass Rivière und Bailhache nur vom Hydrochinongehalt reden.

1) Impfen, Kratzen, sogar dreimonatliches stehen in der Kälte lieferten keine Krystalle.

2) M. Treub. Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes. Ann. Jard. bot. Buitenzorg 2e Serie Vol. XI. 1907.

Im Gegensatz zu *Vaccinium Vitis idaea* konnte ich hier immer Hydrochinon finden, sogar wenn das Töten mit kochendem Alkohol geschah, der die Spaltung der Glykoside soviel wie möglich vorbeugte; wir müssen also annehmen, dass in allen Jahreszeiten hier der Phenolkörper frei in den Zellen vorhanden ist, obschon oft in ganz kleiner Quantität, zum Beispiel in den erwachsenen Blättern am Morgen 0,03 %, am Abend 0,01 %, in den jungen Sprossen jedoch 0,3 %.

Ebenfalls bietet sich in Bezug auf das Arbutin ein Unterschied mit den Ericaceae dar, der in phytochemischer Hinsicht Bedeutung hat, nämlich dass nur ein Hydrochinonglykosid, kein Methylhydrochinonglykosid zu finden ist. In der obenerwähnten, ziemlich grossen Quantität ± 1000 mg. des Aetherextraktes war kein Methylhydrochinon vorhanden. Obschon also im Stammbaum so weit von einander entfernte Pflanzen, wie die Ericaceae und die Species *Pirus communis* ¹⁾ scheinbar in phytochemischer Hinsicht ein ähnliches Verhalten zeigen, so ist dies in Wirklichkeit nicht der Fall, denn das Nebenprodukt, das Methylarbutin der Ericaceae, fehlt beim Birnbaum völlig.

Alle Versuche wurden vorgenommen mit demselben Exemplar var. bonne Louise d'Avranches und die Bestimmungen wurden in derselben Weise wie bei *Vaccinium Vitis idaea* ausgeführt, das Material stets in kochendem Alkohol getötet.

Das Glykosid ist in Knospen, Blättern, Stammrinde, Holz des Stammes und Wurzelrinde nachzuweisen, der Gehalt ist in diesen Teilen sehr verschieden und wechselt

1) In sonstigen Rosaceae sind die Glykoside noch nicht nachgewiesen. Ich untersuchte *Pirus Malus* L. *Cydonia japonica* Pers. und *Rubus Idaeus* L., die ebenfalls beim Absterben sich braun färbten, fand jedoch kein Hydrochinonglykosid oder freies Hydrochinon.

mit der Jahreszeit. (Die Werte sind stets auf Trockengewicht berechnet.)

Vor dem Austreiben im Frühjahr Stammrinde 4,30 %, Holzkörper und Mark zusammengenommen 0,80 %. (Die Zweige waren geschält und das Holz gut abgewaschen.) Beide zusammengenommen 2,20 %. 100 Blütenknospen $\pm$ 400 mg. Arbutin.

Im August. Holz und Stammrinde zusammen 1,50 %, Blätter 1,7 %, Wurzelrinde 0,05 %.

Versuch beim Austreiben der Knospen im Frühjahr.

30 März 1909. Zweige vor dem Austreiben (Holz und Rinde.)

frisch 33 g. trocken 14,5 g.

Hydrochinon 1 mg.

Arbutin 317 " 2,19 %

Glukose ¹⁾ 230 " 1,59 %

26 April 1909. Dem Anschein nach gleiche Zweige, Blüthenknospen und Schösslinge gerade im Austreiben begriffen.

a. Zweige (Holz und Rinde) frisch 31 g. trocken 10,5 g.

Hydrochinon 2 mg.

Arbutin 206 " 1,96 %

Glukose 87 " 0,83 %

b. 32 junge Schösslinge frisch 14,5 g. trocken 3,5 g.

Hydrochinon 5 mg.

Arbutin 48 " 1,37 %

Glukose 78 " 2,23 %

Zusammen Trockengewicht 14 g.

Hydrochinon 7 mg. (+ 6 mg.)

Arbutin 254 " (— 63 ")

Glukose 165 " (— 65 ")

1) Nach Abzug der Arbutinglukose.

2 Mai 1909.

a. Zweige (Holz und Rinde) frisch 28 g. trocken 10.5 g.

Hydrochinon 3 mg.

Arbutin 92 „ 0.88 %

b. 30 junge Schösslinge trocken 3.6 g.

Hydrochinon 13 mg.

Arbutin 140 „ 3.89 %

Zusammen Trockengewicht 14 g.

Hydrochinon 16 mg. (+ 15 mg.)

Arbutin 232 „ (— 85 „

Gerade, wie bei *Vaccinium Vitis idaea* wird auch hier das Arbutin beim Austreiben verbraucht, die Quantität nimmt vom 30 März bis zum 2. Mai um 27% ab. Das Hydrochinon nimmt bedeutend zu von 1 mg. bis zu 16 mg. Dies deutet wieder auf eine Spaltung des Glykosids, dessen aromatische Spaltungshälfte gespeichert bleibt und nur abnimmt, wenn in den jungen Trieben die Assimilation angefangen hat.

18 Mai fand ich in 30 jungen Schösslingen mit 155 Blättern:

8 mg. Hydrochinon Arbutin 800 mg.

Wenn wir die Quantitäten des Hydrochinons und Arbutins vergleichen, die beim Austreiben erscheinen und verschwinden, so sehen wir, dass bei der Enzymspaltung, welche vom obenerwähnten Enzym zu Stande gebracht wird, im Gewebe nicht so viel Hydrochinon zu finden ist, wie wir bei einer völligen Spaltung des verschwundenen Arbutins erwarten müssten ¹⁾, 85 mg. Arbutin ist verschwunden, 15 mg. Hydrochinon erschienen. Beide Zahlen verhalten sich wie 100:18, die Molekulargewichte wie 100:40. Vergleichen wir jedoch die Ab- und Zunahme zwischen 27 April und 2 Mai, so stimmen die Ergebnisse besser

1) Vergleiche die Anmerkung S. 12, über die Arbeit Ciamician's und Ravenna's.

überein. Abnahme des Arbutins 22 mg., Zunahme des Hydrochinons 9 mg., also 100:41. Hier finden wir also die totale Quantität Hydrochinon, die wir bei der völligen Spaltung des Arbutins hätten erwarten können, im Gewebe zurück und zwar zum Teil in den jungen Schösslingen, zum Teil in den Zweigen, was stimmt zu den Ergebnissen, welche ich bei *Salix purpurea* erhielt.¹⁾

Das Arbutin nimmt vom Austreiben an, stark in den jungen Schösslingen zu; am 18. Mai war die Menge in den jungen Teilen schon viel mehr als am 27. April in den Zweigen, dem Holz und der Rinde zusammen, aus denen sie gesprossen. Dies muss neugebildetes Arbutin sein, denn aus andern Teilen des Birnbaums kann es nicht oder nur zum geringen Teil herkommen, jeder Zweig des Exemplars hatte nämlich seine eignen Knospen, die in derselben Weise beim Austreiben die Reservestoffe dieses Zweiges benutzten.²⁾

Unumgänglich war deshalb das Studium der Rolle, die das Arbutin beim Assimilationsprozess spielt.

Dazu halbierte ich an mehreren Sommerabenden 100 Blätter des obigen Exemplars, bestimmte darin die Quantität Arbutin und Hydrochinon, die andere Hälfte jedes Blattes wurde mit dem Mittelnerv an der Pflanze gelassen und am folgenden Morgen beim Sonnenaufgang von dem Mittelnerv abgeschnitten und ebenfalls analysiert.

1^o September 1908. 100 halbierte Blätter am Abend.

Hydrochinon 1 mg.

Arbutin 287 „

1) Die Hydrochinon Zunahme ist in den jungen Schösslingen am grössten, was auf eine dortige Arbutinspaltung hinzuweisen scheint. Trifft dies zu, so liegt es ja auf der Hand anzunehmen, dass das Arbutin qua talis transportiert werde, was jedoch zu den Beobachtungen bei *Vaccinium* *Vitis idaea* im Gegensatz stehen würde.

2) Die Wurzeln enthalten nur ganz kleine Quantitäten.

Kontrollversuch am folgenden Morgen

Hydrochinon 7 mg. (+ 6)

Arbutin 250 " (— 37)

2^o October 1908.

100 halbierte Blätter am Abend.

Hydrochinon 2 mg.

Arbutin 281 "

Kontrollversuch am folgenden Morgen

Hydrochinon 5 mg. (+ 3)

Arbutin 269 " (— 12)

3^o August 1909.

100 halbierte Blätter am Abend.

Hydrochinon 1 mg.

Arbutin 384 "

Kontrollversuch am folgenden Morgen

Hydrochinon 5 mg. (+ 4)

Arbutin 358 " (— 26)

Immer nimmt also das Arbutin während der Nacht ab, das Hydrochinon zu, gerade sowie es bei *Salix purpurea* für Salicin und Catechol gezeigt wurde, jedoch verhalten sich die Zunahme des Hydrochinons und die Abnahme des Arbutins nicht wie die Molekulargewichte. Nimmt man die drei Versuche zusammen, so ist die Zunahme des Hydrochinons 13 mg., die Abnahme des Arbutins 75 mg. also 17:100¹⁾; während die Molekulargewichte sich verhalten wie 40:100. Damit stimmt ein vierter Versuch, bei dem ich am Abend das total Hydrochinon bestimmte nach Kochen mit Salzsäure, und ebenfalls am folgenden Morgen. Letztere Quantität war auf 100 halbe Blätter 5 mg. kleiner. Wenn also die totale nächtliche Abnahme des

1) Also fast wieder dasselbe Verhältniss wie beim Austreiben im Frühjahr.

Arbutins einer Spaltung zu verdanken ist, worauf die Anwesenheit obengenannten Enzyms hindeutet, so kann man nicht sagen, dass die aromatische Hälfte als Hydrochinon *völlig* im Blatte gespeichert bleibt um später neugebildete Glukose wieder zu Arbutin zu binden, nur zum Teil kann dies der Fall sein, das übrige Hydrochinon muss sofort in den Stoffwechsel einbezogen werden. Eine andere Möglichkeit bleibt jedoch, dass zwar alles Hydrochinon im Blatte gespeichert, aber das Arbutin nur zum Teil gespalten, zum Teil qua Glykosid transportiert werde. Im späten Herbste, wenn die Blätter orangegelb geworden und im Abfall begriffen sind, ist die Quantität Arbutin noch ziemlich gross, jedoch viel kleiner als in den grünen Blättern.

Pro 100 Blätter 340 mg. Hydrochinon. Glukose 250 mg.

Bekanntlich werden die Blätter von *Vaccinium Vitis idaea* und *Pirus communis* beim normalen Absterben schwarz. Sehr schön kann man es demonstrieren, wenn man die Blätter in ein Wasserbad von $\pm 55^{\circ}$ C. bringt; sowohl im Wasser, als auf der Grenze des Wassers sterben die Teile schnell ab, das Enzym wird nicht zerstört. (Nekrobiose Beyerinck's¹⁾). Im Wasser wird der braune Farbstoff, der bei der Oxydation sich bildet, rasch ausgezogen und werden die Teile deshalb nicht so schwarz wie beim Absterben in der Natur, überdies hat der Sauerstoff wenig Zutritt. Die Teile auf der Grenze des Wassers werden jedoch tiefschwarz.

Bringt man die Blätter in kochendes Wasser so bleiben sie grün, weil auch das Enzym zerstört wird (Nekrose Beyerinck's). Es gelang mir durch Zerreiben und Auspressen der jungen Teile einen Saft zu erhalten, der mit Alkohol

1) Beyerinck. Over de indigovorming uit de weede. Versl. Koninkl. Akad. v. Wetenschappen afd. Nat. Deel VIII.

versetzt einen Niederschlag gab. Dieser bildete, in Wasser gelöst, eine fast farblose Flüssigkeit, die nach einigen Tagen sich nur wenig braun färbte, fügte man jedoch zu dieser Oxydaselösung eine Hydrochinonlösung, die sich selbst überlassen, tagelang sich fast nicht änderte, so war die Mischung nach 2×24 Stunden dunkelschwarz gefärbt. Das Chromogen der Birn- und Preiselbeerenblätter ist also Hydrochinon ¹⁾).

Die alten Blätter von *Vaccinium Vitis idaea*, worin ich kein Hydrochinon nachweisen konnte, werden dennoch bei der Nekrobiose schwarz. Dann muss also, das bei der Arbutinspaltung gebildete Hydrochinon, das sonst im Stoffwechsel sofort weiter verarbeitet wird und dadurch nicht nachzuweisen ist, unter Einfluss der Oxydase den schwarzen Stoff liefern, ein neuer Beleg also für die fortwährende Zersetzung des Arbutins.

Diese Oxydaselösung färbt ebenfalls Catechol, lässt jedoch eine Tyrosinlösung unverändert und gibt keine Farbenreaktion mit Parakresol (Vergleich unten bei *Salix*).

Versuche mit *Salix purpurea* L.

Bei der ersten Arbeit im Jahre 1903 hatte ich schon konstatiert, dass die direkt in kochendes Wasser gebrachte Rinde von *Salix purpurea* Zweigen 0.6 % Glukose und 4.3 % Salicin enthielt, dagegen derartige im Trockenschrank nicht zu schnell getrocknete Rinde 1.2 % Glukose und 3.3 % Salicin. Beim Trocknen wurde also das Salicin zer-
setzt und Glukose gebildet; es gelang mir jedoch damals nicht ein Enzym, das eine solche Wirkung hervorrufen konnte, nachzuweisen.

Später erzielte ich bessere Resultate: im Frühjahr 1908

1) Das Chromogen von *Melampyrum pratense* L. und *Monotropa Hypopitys* L. ist kein Hydrochinon.

wurde die Rinde junger Schösslinge mit 96 % Alkohol übergossen und an der Luft stehen gelassen. Der Alkohol verdunstete zum Teil. Wasser wurde hinzugefügt und die Flüssigkeit abfiltriert.

Die klare, gelbe Flüssigkeit wurde mit einem Stückchen Thymol als Antiseptikum beschickt und enthielt, sich selbst überlassen, pro 10 cc. nach 24 Stunden 9 mg. Glukose, nach 2×24 Stunden 10 mg. Glukose, nach 4×24 Stunden 11 mg. Glukose. Drei Erlenmeyer Kölbchen, jedes mit 10 cc. dieser Lösung, wurden jedes mit 330 mg. Salicin beschickt.

Nach 24 Stunden enthielt das Kölbchen 27 mg. Glukose.

Nach 2×24 " " " " 45 " "

Nach 4×24 " " " " 30 " "

Beim Ersten war also 18 mg. Glukose durch Spaltung des Salicins entstanden, beim Zweiten 32 mg., beim Dritten 19 mg. Von den 330 mg. Salicin war nach 24 Stunden 9 %, nach 2×24 Stunden 17 %, nach 4×24 Stunden wiederum nur 9 % gespalten. Andere Versuche gaben ähnliche Resultate, so erhielt ich z. B. eine Spaltung von 22 % und 26 % des hinzugefügten Salicins.

Dies deutet also entschieden auf das Vorhandensein eines salicinspaltenden Ferments.

Bessere Resultate erzielte ich noch in folgender Weise: junge Schösslinge von *Salix purpurea* wurden im Mörser fein zerrieben, der Brei durch seidene Planktongaze koliert und der Saft mit einem Uebermass von Alkohol versetzt. Sofort wurde der Alkohol abfiltriert, der farblose Niederschlag mit Alkohol gewaschen und in Wasser gelöst. Diese Lösung enthielt weder Catechol noch Saligenin und reduzierte nach Kochen und Abfiltrieren die Fehlingsche Lösung nicht.

Wurde einem Teil dieser Lösung 100 mg. Salicin hinzugefügt, so war nach 24 Stunden 18 %, nach 2×24 Stunden

bei 40° C. 28 % und nach 3 × 24 Stunden 46 % des Salicins gespaltet. Diese Spaltung wurde in folgender Weise nachgewiesen: die Flüssigkeit wurde mit Aether ausgeschüttelt, und nach Entfernung des gelösten Aethers die Glukosemenge bestimmt; der Aetherextrakt enthielt Saligenin, das in der üblichen Weise erkannt wurde. Der Aetherrest wurde nämlich sublimiert, das Sublimat zeigte die typische Kristallform, besonders beim Auskristallisieren aus wässriger Lösung und gab ebenfalls die Reaktionen mit Kupferacetat, Ferrichlorid und konzentrierter Schwefelsäure. Damit ist also das Vorhandensein eines salicinspaltenden Enzyms in den jungen Schösslingen und in der Rinde von *Salix purpurea* nachgewiesen. ¹⁾

Weil auch das Emulsin Salicin spaltet, war es notwendig zu untersuchen ob dieses Enzym, Salikase, mit Emulsin identisch sei. Dies war nicht der Fall, denn die Salikase hatte keine Wirkung auf Amygdalin, weder wurde Blausäure abgespaltet, noch war Glukosebildung nachzuweisen, von Amygdalase ²⁾ ist das Salixenzym also auch verschieden.

1) Nachdem ich meine Untersuchungen schon abgeschlossen hatte, konnte ich Einsicht nehmen von einer Mitteilung über ein salicinspaltendes Enzym. W. Sigmund (Sitzber. Akad. der Wiss. Wien CXVII Bd. IX 1909) hat aus der *Salix caprea*, *S. alba*, *S. fragilis* und aus *Populus alba*, *P. tremula*, *P. pyramidalis* ein Enzym erhalten, das Salicin spaltet und ebenfalls aus *Calluna vulgaris* und *Vaccinium Myrtillus* ein Enzym, welches Arbutin in Hydrochinon und Glukose spaltet. Ersteres wurde mit dem Namen Salikase, zweites mit dem Namen Arbutase belegt.

2) Armstrong H. C., Armstrong E. F. und Horton E. Studies in Enzym Action XII The enzymes of emulsin. Proc. Roy. Soc. 1908 haben gezeigt, dass das sogenannte Mandelemulsin, drei spezifische Enzyme enthält nl. 1o Gluco-lactase, 2o. Amygdalase, die Amygdalin in Amydonitrilglykosid und Glukose spaltet, 3o. β Glukase, das eigentliche Emulsin. Caldwell und Courtauld Studies in enzym Action. Proc. Roy. Soc. London 1907, haben zuerst die Amygdalase in der Hefe nachgewiesen.

Ebenfalls ist es von dem arbutinspaltenden Enzym verschieden, denn dies hatte keine oder nur sehr schwache Wirkung auf Arbutin und umgekehrt hydrolysierte die Salikase das Arbutin nicht.

Obige Versuche mit dem Rindenextrakt zeigen überdies, dass nach einiger Zeit die Spaltung wieder rückgängig werden kann, deuten also auf eine reversibele Wirkung der Salikase hin. Croft Hill¹⁾ digerierte eine 40 prozentige Glukoselösung bei 30° C. mit Hefemaltase und eine langsame Umwandlung in Maltose und Revertose fand statt. Nach 5 Tagen war 3.25 % der Glukose umgewandelt, nach 70 Tagen 14.5 %, damit war der Gleichgewichtszustand erreicht. Bei weniger konzentrierten Zuckerlösungen war der Gleichgewichtspunkt nicht der Nämliche, bei 20 prozentiger Lösung 9.5 % Maltose und Revertose, bei 10 prozentiger Lösung 5.5 %. Später hat Kohl²⁾ derartige Versuche mit Invertin gemacht und ist es Emmerling³⁾ gelungen mit Hefeenzym aus Mandelsäurenitrilglykosid und Glukose Amygdalin zu erhalten.

Ich fügte eine Salikaselösung, welche die Fehlingsche Lösung nicht reduzierte zu 10 cc. einer 5 prozentigen Glukoselösung, die mit 30 mg. Saligenin beschickt war, und machte drei derartige, ganz gleiche Lösungen.

Die erste wurde sofort auf ihr Reduktionsvermögen geprüft und enthielt 50 mg. Glukose, die zweite nach 24 Stunden enthielt 47.5 mg. Glukose, die dritte wurde nach 24 Stunden gekocht mit Salzsäure, abfiltriert zur Entfernung des gebildeten Saliretins⁴⁾ und enthielt 50.1 mg. Glukose.

1) Croft Hill. Reversible zymohydrolysis Journ. Chem. Society. Trans. 1898. In 1903 hat dieser Autor gezeigt, dass das Reversionsprodukt nur zum Teil Maltose, zum andern Teil Revertose ist. Journ. Chem. Soc. T. 1903.

2) Kohl. Beih. zum bot. Centralbl. XXXIII.

3) Emmerling. Ber. chem. Ges. Bd. XXXIV 1901.

4) Saligenin reduziert die Fehlingsche Lösung nicht, Saliretine reduziert sie.

Dies deutet ebenfalls auf eine Salicinbildung hin, denn Salicin reduziert die Fehlingsche Lösung nicht; ist also durch die Salikase ein Teil der Glukose mit Saligenin unter Wasserabspaltung zu Salicin vereinigt, so muss das reduzierende Vermögen kleiner werden. Wird später das gebildete Salicin durch verdünnte Säure gespalten, so muss die Quantität Glukose wieder die nämliche sein wie vorher. Bei andern derartigen Versuchen blieb jedoch die Quantität Glukose gleich gross, sodass es noch dahingestellt bleiben muss, ob hier wirklich von einer Reversion die Rede sei oder nicht.

Jedenfalls kann derart in der lebenden Pflanze die Salicinbildung aus Saligenin und Glukose zu Stande kommen, die Bedingungen dazu in Erfüllung gehen zu lassen, gelingt in Vitro nicht so leicht.

Dieses Auffinden eines salicinspaltenden Enzyms in den jungen Schösslingen der *Salix purpurea* wirft auch ein überraschendes Licht auf einige früher erhaltenen Ergebnisse.

Ich isolierte die Salikase aus jungen Schösslingen, die Salicin enthielten und ebenfalls aus der Rinde, wo das Salicin in steter Abnahme begriffen war und wo dennoch in dieser Zeit durchaus kein Saligenin zu finden war. Dies belegt, wie schnell die Umwandlung des Saligenins vor sich gehen muss, eine Umwandlung, die wie ich früher schon wahrscheinlich gemacht habe, das Catechol als Endprodukt hat.

Dies veranlasste mich meine frühere Untersuchungen wieder aufzunehmen und in erster Linie noch einmal zu prüfen ob vielleicht nur eine ganz kurze Zeit das Saligenin in bedeutender Quantität zu finden wäre, denn wie schon vorher gesagt wurde, hatte ich das Saligenin nur in verschwindend kleinen Spuren in den Knospen nachweisen können.

Zu dieser Untersuchung brauchte ich ein gutes Trennungsvorgehen des Catechols (Orthodioxybenzol) und des Saligenins (Orthooxybenzylalkohol), die beide bekanntlich im Aetherextrakt der wässerigen Lösung zu finden sind. Dazu wurde der Aetherrest in heissem Wasser gelöst und mit Bleiacetat versetzt, dessen Übermass ich mit Dinatriumphosphat entfernte. Nachdem die Flüssigkeit mit Aether ausgeschüttelt worden, war im Aetherextrakt nur Saligenin zu finden, Catechol wurde durch das Bleiacetat gefällt.

Hätte ich jedoch beide Phenolkörper, Saligenin und Catechol neben einander nachzuweisen, so benutzte ich die eine Hälfte des Aetherextraktes zum Catecholnachweis, die andere zur Saligeninbestimmung.

Der quantitative Nachweis des Saligenins geschah durch Vergleichung des Sublimats mit dem einer bekannten Menge reinen Saligenins, gerade wie für Catechol und Hydrochinon klargelegt wurde.

Zuerst verglich ich die Quantität beider Phenolkörper in 200 jungen Schösslingen derselben Sträucher an verschiedenen Daten beim Austreiben im Frühling.

25 April 1909 200 junge Schösslinge					34 mg. Catechol — Saligenin.
28	"	"	"	"	26 " " — "
2	Mai	"	"	"	9 " " — "
5	"	"	"	"	1 " " — "
8	"	"	"	"	2 " " 7 "
16	"	"	"	"	1 " " 24 "
28	"	"	"	"	35 " " — "
Juli Johannistriebe					viel " " -- "

In der Rinde mehrjähriger Zweige war niemals, auch nicht am 16. Mai, Saligenin zu finden, stets war Catechol darin vorhanden.

In andern Exemplaren fand ich im Jahre 1908 (Die Daten sind deshalb nicht vergleichbar):

Das Verfahren war ganz dasselbe wie dasjenige zur Bereitung der Salikase, das erhaltene Rohprodukt war ein Gemisch mehrerer Enzyme, wie ich unten noch weiter dartin will. Hier interessiert uns jedoch eine Oxydase, die ich in meiner ersten Arbeit Tyrosinase genannt habe.

Nach der neueren Nomenklatur von Bach, Chodat ¹⁾ und Bertrand ²⁾ ist dies jedoch unrichtig, denn die Tyrosinase dieser Autoren wird mit Parakresol fast unmittelbar gelb, dann goldgelb und zuletzt wird die Flüssigkeit trübe und braun. Diese typische Tyrosinase färbt eine Tyrosinlösung nach einigen Stunden rötlich, später schwarz und im Allgemeinen kann man sagen, dass sie nebst Tyrosin auch diejenige Benzolderivate oxydiert, die eine Hydroxylgruppe und eine Seitenkette am Benzolkern haben, besonders die Paraverbindungen, weniger die Meta-, noch weniger die Orthoverbindungen.

Die Oxydase aus den jungen Teilen der *Salix purpurea* färbt eine Tyrosinlösung *nicht* und gibt keine charakteristischen Reaktionen mit den drei Kresolen, bei allen erhält man eine schwache, zuerst milchartige, später schmutzig gefärbte Trübung, die beim Orthokresol noch am deutlichsten ist. Ebenso wird von den Dioxybenzenen das Catechol, die Orthoverbindung am schnellsten oxydiert, weniger gut die Paraverbindung (Hydrochinon), noch weniger die Metaverbindung (Resorcin); das Enzym ist also nicht Tyrosinase. Mit einer Catechollösung (10 mg. pro 1 c.c.) die, sich selbst überlassen nur nach mehreren Tagen sich dunkel färbt, zusammengebracht, gibt das Rohenzym fast sofort eine grüne Flüssigkeit und schon nach fünf Minuten erhält man einen schwarzen Niederschlag. (Wie

1) R. Chodat. Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. Arch. d. Sc. phys. et nat. Genève. vol. 24.

2) Bertrand. Action de la tyrosinase sur quelques corps voisins de la tyrosine. Ac. d. Sc. 1907.

schon obengesagt wurde, war die Rohenzymlösung eine fast farblose, etwas trübe Flüssigkeit, die während 24 Stunden fast unverändert blieb.)

Ebenfalls ist die *Salixoxydase* verschieden von dem System Hydroperoxyd-peroxydase ¹⁾, durch sein Betragen den Kresolen gegenüber, denn dieses System gibt mit Orthokresol einen gelben, dann dunkelbraunen Stoff; färbt eine Catechollösung zuerst gelb, dann braun bis schwarz. Mit einer Guajakemulsion zusammengebracht, gibt das System Hydroperoxyd-peroxydase die Guajakbläuung, die *Salixoxydase* dagegen lässt die Guajakemulsion unverändert, wenn H_2O_2 hinzugefügt wird und oxydiert eine Pyrogalllösung nicht. ²⁾

Das Rohenzym zerlegt Wasserstoffsuperoxyd in Wasser und molekularen Sauerstoff und enthält also eine Katalase (Superoxydase).

Schoenbein ³⁾ hat zuerst die allgemeine Verbreitung dieser Enzyme im Pflanzenreich nachgewiesen, später

1) Die Peroxydase war aus Meerrettig bereitet und durch 96% Alkohol gefällt, dann in Wasser gelöst. Von Chodat wird dieses System stets mit der Lakkase verglichen. Dieses Wort Lakkase wurde von Bertrand zuerst für das Rohenzym aus *Rhus vernicifera*, dem japanischen Lackbaum benutzt, später hat er mit dem Worte Pilzlakkase, ein Enzym benannt, das er z. B. aus *Russula species* isolierte. Letzteres wurde durch Alkohol nicht gefällt und so von der ebenfalls anwesenden Tyrosinase getrennt, es oxydiert wie die *Rhus*-Lakkase ganz gut Hydrochinon zu Chinhydron, ebenfalls oxydiert es Pyrogallol, bläut die Guajak-Emulsion und färbt die Kresolen, ganz wie obengenanntes System Hydroperoxyd-peroxydase.

2) Das Rohenzym aus *Salix purpurea* gibt eine violette Färbung mit Salzsauerm Tetramethyl-p-Phenylendiamin, ist jedoch von der Oxydase aus Bierhefe und der Spermase aus Gerstenmalz verschieden, denn die Rohenzyme aus *Saccharomyces cerevisiae* und Gerstenmalz färben eine Catechollösung nicht.

3) Schoenbein. Journ. prakt. Chem. 1867.

hat O. Loew¹⁾ sie mit dem Namen Katalase belegt und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel studiert. Die Katalasen Loew's gaben keine Guajakreaktion und keine Indophenolprobe, ebensowenig wie unser Rohenzym.

Eine Katalase liegt also vor, die Frage ist nun ob neben der Katalase noch eine andere Oxydase in den *Salix*knospen vorhanden sei oder nicht.

Dazu verglich ich das Verhalten des Rohenzym aus *Salix purpurea* mit dem einer aus Malz dargestellten Katalaselösung. Letztere zeigte durchaus nicht die charakteristische Reaktion mit Catechol oder Saligenin, lässt eine Lösung dieser Stoffe unverändert. Ebensowenig erhielt Loew mit seinen Katalasen pflanzlicher Herkunft eine Reaktion mit Hydrochinon, während das Salixrohenzym, zwar aus Hydrochinon kein Chinhydron bildet aber die Lösung doch schnell braun färbt.

Neben der Katalase muss also in dem Rohenzym noch eine andere Oxydase vorhanden sein, die diese Reaktionen mit den Benzolderivaten gibt, oder die Katalasen sind in ihrem Verhalten, den aromatischen Körpern gegenüber, völlig von einander verschieden, sodass man mehrere Katalasen unterscheiden muss. Dies blieb unentschieden, denn es gelang mir nicht durch Erhitzen des Rohenzym entweder die Eigenschaft der H_2O_2 -Zerlegung oder der Catecholschwärzung zu zerstören, sogar beim Erwärmen bis auf 90° C. blieben die Katalasereaktion und die Schwärzung der Catechollösung, obschon geschwächt, beide noch ganz deutlich. Beim *Erhitzen* während *einer* Minute auf 100° C. sind beide völlig zerstört.

In physiologischer Hinsicht interessierte mich natürlich am meisten, wie sich das Enzym in Bezug auf das Saligenin verhalte. Fügt man das Rohenzym zu einer Saligenin-

1) O. Loew. Zeitschr. Biolog. Bd. XLIII.

lösung so tritt zwar *langsamer*, aber am Ende dennoch ebenso deutlich, wie bei Catechol, die Bildung des schwarzen, amorphen, in Wasser fast unlöslichen Stoffes hervor ¹⁾.

Obschon dem Anschein nach, die Zersetzung des Catechols sehr schnell geschieht, ist dies nicht der Fall, denn man wird durch die intensiv schwarze Farbe sehr getäuscht. Ganz dasselbe trifft für Saligenin zu; ich beschickte eine Lösung von 1 mg. Saligenin in 2 cc. Wasser mit einigen Tropfen der Rohenzymlösung und erhielt einen sehr deutlichen Niederschlag. Die Lösung enthielt jedoch ebenfalls noch Saligenin, von dem 1 mg. war nur drei Viertel verschwunden.

Ich versuchte nun auch, ob diese beiden Oxydationen des Saligenins und des Catechols von einem selben Enzym verursacht würden, und war bei der Trennung mittels Erwärmens glücklicher als oben. Nach dem Erwärmen der Rohenzymlösung bis auf 85° C. war die Oxydation des Catechols noch ganz deutlich, eine Saligeninlösung blieb dagegen völlig unverändert, offenbar liegen also zwei verschiedene Enzyme vor, die ich bequemlichkeitshalber nach ihren charakteristischen Reaktionen Catecholase und Saligeninase nennen möchte ²⁾; ersteres, die Catecholase, bildet

1) Ob dieser schwarze Stoff, mit den bei alkalischer Reaktion aus Homogentisinsäure gebildeten Produkten identisch sei, konnte ich nicht erforschen. Auch durch sehr wenig Alkali wird das Catechol schwarz gefärbt, das Salix-Rohenzym braucht jedoch eine alkalische Lösung nicht, nur in zu stark sauren Media tritt die Schwärzung nicht ein.

2) Beide können also nach Obenstehendem Katalasen sein, brauchen es jedoch nicht zu sein, in letzterem Falle jedoch müssen sie von einer echten Katalase begleitet werden. Chod at. Ber. D. Chem. Ges. Bd. XXXV hat gezeigt, dass Peroxydasen und Katalasen gleichzeitig vorkommen können, ohne sich bei Ausübung ihrer spezifischen Funktion zu stören.

aus Catechol das schwarze Produkt, beide zusammen bilden aus Saligenin dem Anschein nach, denselben schwarzen Stoff; am Wahrscheinlichsten ist es also, dass die Saligeninase das Saligenin zu Catechol oxydiere. Dies zu beweisen gelang in Vitro nicht, weil ich die Saligeninase nicht von der Catecholase trennen konnte und also das gebildete Catechol sofort von letzterer Oxydase zersetzt wurde.

Im Gewebe liegen die Verhältnisse jedoch ganz anders, da geschieht die Catecholzersetzung und Bildung des schwarzen Stoffes lediglich bei Nekrobiose, nicht im lebenden Gewebe; ich meine weil die Catecholase in den Zellen räumlich von dem Catechol getrennt ist ¹⁾, dagegen die Saligenase auf das Saligenin einwirken kann.

Dort in der lebenden Pflanze findet also nur die Umwandlung des Saligenins in Catechol statt, die Zersetzung des Saligenins muss jedoch schneller geschehen als ich in Vitro beobachten konnte.

Jedenfalls liefert die Spaltung des Saligenins mittels der vereinigten Wirkung beider Oxydasen das Beispiel einer Oxydation des Saligenins (Orthodioxymethylalkohols $C_6H_4(CH_2OH)OH$ wobei nicht, wie sonst stets im Laboratorium der Fall ist Salicylsäure das Endprodukt ist. ²⁾ Diese Spaltung beseitigt deshalb die Einwendung, die in chemischer Hinsicht wieder die Möglichkeit der Umwandlung des Saligenins in Catechol gemacht werden könnte.

1) Die Annahme einer räumlichen Trennung kommt mir viel wahrscheinlicher vor, als die Erklärung Palladins (die Atmungspigmente der Pflanzen, Hoppe Seylers Zeitschr. 1908), dass eine Bildung des Chromogens nur selten in den lebenden Pflanzen statt finde, weil der durch das Enzym auf das Chromogen übergetragene Luftsauerstoff durch Reduktasen wieder abgespalten werde.

2) Auf gelöste Salicylsäure hatten die Enzyme durchaus keine Wirkung.

Das Rohenzym oxydiert wie schon oben gesagt wurde ebenfalls die Hydrochinonlösung. Eine sich selbst überlassen mehrere Tage unverändert bleibende Lösung dieses Körpers wurde mit dem Rohenzym nach einer Stunde rötlich nach sechs Stunden braunrot gefärbt. Dies stimmt also ganz gut überein mit der Wirkung des aus *Vaccinium* erhaltenen Rohenzym. Es zeigte sich, dass dieses im Grossen und Ganzen dieselben Reaktionen gibt ¹⁾, ebenfalls Katalase enthält, aber Saligenin *nicht* oxydiert, die Saligeninase fehlt hier also.

Bei der ersten Arbeit hatte ich keine Gelegenheit die etwaigen Änderungen der Quantität des Catechols und des Salicins beim Austreiben im Frühjahr zu vergleichen, darum habe ich einige diesbezüglichen Versuche wiederholt und neue hinzugefügt um desto besser konstatieren zu können, ob die genannte Hypothese, das Catechol sei das endgültige Spaltungsprodukt des Salicins, richtig wäre oder nicht.

Beim Austreiben in Wasser gestellter Zweige im Dunkeln nimmt das Salicin bedeutend ab, das Catechol zu, ich habe die Quantität beider Stoffe verglichen und erhielt folgendes Resultat.

2 Mai 1909. Rinde vor dem Austreiben im Dunkeln.

Catechol	0.21 %	90 mg.
Salicin	2.35 %	987 „

3 Juli 1909. Rinde nach dem Austreiben im Dunkeln ²⁾.

Catechol	0.45 %	165 mg.
Salicin	1.67 %	619 „

1) Das *Vaccinium*enzym gab eine schwache Indophenolreaktion.

2) Vor dem Austreiben wurden von dicken Aesten Stücke abgeschnitten und analysiert, die übrigen Teile wurden in Wasser gestellt und nach dem Austreiben der etiolierten Schösslinge analysiert. Die Salicinbestimmung geschah wie in der ersten Abhandlung klargelegt wurde.

120 junge Schösslinge

Catechol	0.37 %	15 mg.
Salicin	3.0 %	120 „
kein Populin, kein Saligenin		
Zusammen nach dem Austreiben	181 mg.	Catechol.
	739 „	Salicin.

Das Catechol hatte also um 90 mg. zugenommen, das Salicin um 248 mg. abgenommen, die Quantitäten verhalten sich wie 36 : 100; die Molekulargewichte wie 38 : 100.

Das stimmt also ganz gut, ebenso wie die Ergebnisse des in der ersten Abhandlung mitgeteilten Etiolierungsversuchs.

Vergleichen wir nun die Werte beim Austreiben der Sträucher im Freien, so bekommt man weniger gute Resultate, denn die Teile bilden kein abgeschlossenes Ganzes. Zufuhr und Abfuhr, Assimilation ist möglich, überdies beeinträchtigt das Vorhandensein des Populins die Ergebnisse, wie ich weiter unten dartun will.

27 März. Rinde und Knospen. (Zweiglänge 7.20 M.)

frisch 47 g. trocken 23.3 g.		
Catechol	0.16 %	38 mg.
Glukose	1.81 %	422 „
Salicin	6.79 %	1582 „

25 April. Knospen ausgetrieben.

a. Rinde. (Zweiglänge 7.15 M.)

frisch 45 g. trocken 20 g.		
Catechol	0.55 %	110 mg.
Glukose	1.95 %	391 „
Salicin	4.55 %	909 „

b. 250 junge Schösslinge trocken 4.8 g.

Catechol	0.46 %	22 mg.
Glukose	1.25 %	60 „
Salicin	4.50 %	216 „
Populin	2.09 %	100 „

Zusammen Salicin	1125 mg.	also —	457 mg.
Populin	100	"	
Catechol	132	"	+ 94 "

Die Zunahme des Catechols verhält sich zu der Abnahme des Salicins wie 21 : 100.

Auch in anderen Fällen, wenn ich die Quantitäten Salicins und Catechols vor und nach dem Austreiben nicht gut vergleichen konnte, weil die Äste zu sehr verschieden waren, fand ich immer eine starke Zunahme des Catechols sowohl prozentisch wie absolut, ein neuer Beleg also, dass Catechol das definitive Produkt der Salicinspaltung ist.

Ebenfalls tun dies neue Versuche mit halbierten Blättern, bei denen die nächtliche Änderung der Quantitäten des Salicins und des Catechols verglichen wurden.¹⁾

Fünf Versuche, jeder mit 200 halbierten Blättern wurden an einigen Tagen gemacht und die gefundenen Werte addiert.

Ich fand für 1000 halbierte Blätter.

August. Abends 8 Uhr 1023 mg. Salicin, 83 mg. Catechol.

Morgens 5 Uhr 827 mg. Salicin, 142 mg. Catechol.

Das Catechol nimmt um 59 mg. zu, das Salicin um 196 mg. ab, beide Zahlen verhalten sich wie 30 : 100. Das Resultat ist fast dasselbe wie bei den Versuchen im Jahre 1902, wo ich das Verhältnis 31 : 100 fand.

In der Rinde dagegen nimmt während der Nacht das Salicin zu, das Catechol ab; hier sind die Zahlen wieder nicht so gut vergleichbar, weil die Äste selbst nicht so gut vergleichbar sind und auch kein abgeschlossenes Ganzes bilden.

1) Derartige Versuche habe ich auch früher angestellt, aber mit einer viel kleineren Zahl Blätter, obige Resultate sind deshalb genauer. Nur die Werte für Salicin und Catechol sind erwähnt, diejenige für Glukose nicht.

Auf 20 M. Zweiglänge mit 1000 Blättern, war in der Nacht die Zunahme des Salicins ± 290 mg., die Abnahme des Catechols 61 mg., also 21 : 100.

Im Allgemeinen jedoch bestätigen diese Ergebnisse völlig die Hypothese. In der Nacht wird in den Blättern das Salicin gespalten, das Catechol bleibt an der Stelle, Glukose wird nach der Rinde transportiert und bildet dort aufs neue Salicin mit Hilfe des dortigen Catechols.¹⁾ Am Tage entsteht in den Blättern wieder neues Salicin aus Assimilationsprodukten und während der Nacht freigeskommenes Catechol, mit anderen Worten Catechol bildet aus dem Transportstoff Glukose den transitorischen Reservestoff Salicin.

Im Frühjahr wird das Salicin der Rinde gespalten und die Glukose verbraucht, das Catechol bleibt zum grössten Teil gespeichert, teils in der Rinde, teils in den jungen Schösslingen. Nur später im Sommer, wenn wieder ein Uebermass von Assimilationsprodukten der Rinde zufliesst, wird dieses Catechol der Rinde wieder in Salicin verwandelt, dann nimmt der Catecholgehalt wieder von $\pm 0.7\%$ ab bis $\pm 0.13\%$, dem Salicingehalt zu.

Diese Salicinbildung erfolgt auch ganz gut in unterirdischen Teilen; die einige mm. dicken Wurzeln enthalten Salicin, ebenfalls Zweigstücke, welche als Stecklinge gedient und 4 Jahre im Boden gestanden hatten.

In kleinen Sträuchern mit viel Blättern ist im Herbst der Salicingehalt der Rinde so hoch, dass er dem in den Blättern gleichkommt, 6 bis 7% des Trockengewichts.²⁾ Wenn ich in dieser Zeit, zum Beispiel in den heissen Oktobertagen von 1908 (Temperatur 12 Uhr Nachmittags 70° C.,

1) Ob dabei Saligenin ebenfalls das Zwischenprodukt ist, konnte ich nicht entscheiden.

2) Für grosse Sträucher mit relativ wenig Blättern trifft dies nicht zu.

in der Nacht $\pm 50^{\circ}$ C.) die Quantitäten Catechol und Salicin in den Blatthälften bestimmte, fand ich Abends und Morgens gleiche Werte (pro 100 Blatthälften 9 mg. Catechol, 80 mg. Salicin); die Blätter hatten in der Sonne gestanden von Morgens 8 Uhr bis Mittags 2 Uhr. Ob demnach die Salicinkonzentration die Stoffwanderung beeinflusst oder nur das Konzentrationsgefälle der Glukose sie beherrscht, wäre noch weiter zu untersuchen; Rywosch¹⁾ hat darauf gewiesen, dass das Konzentrationsgefälle auch durch die aus den Leitbündeln in die umgebenden Zellen austretenden Wassermengen zu Stande kommt.

Im November enthalten die gelben, eben abfallenden Blätter (noch keine Nekrobiose, sonst werden sie schwarz) pro 100 ganze Blätter:

Catechol	3 mg.
Salicin	42 „
Glukose	90 „

Beide, Catechol und Salicin, also beträchtlich weniger als im Sommer; auch das Catechol scheint also im Herbst transportiert oder im Stoffwechsel zerstört zu werden.²⁾ Letzteres kommt mir wahrscheinlicher vor, denn der Catecholgehalt der Rinde nimmt im Herbst nicht zu.

Das Populin der *Salix purpurea*.

Beim Vorhergehenden habe ich absichtlich das Populin noch völlig ausser Acht gelassen. In meiner ersten Arbeit erwähnte ich das Vorkommen des Populins in der Rinde und in den Blättern und fand den Populingehalt in den Blättern Abends und Morgens fast gleich, ein Betragen

1) Rywosch. Zur Stoffwanderung im Chlorophyllgewebe. Bot. Ztg. LXVI.

2) Vergleiche das auf Seite 12 darüber Gesagte.

dem des Salicins völlig entgegengesetzt ¹⁾. Zur Bestimmung extrahierte ich damals die Teile mit kochendem Wasser und versetzte den Extrakt mit Bleiacetat und Dinatriumphosphat (es wurde nur heiss filtriert, damit das Populin nicht auskristallisierte). Die Lösung brachte man auf Volum und liess sie erkalten, filtrierte das ausgeschiedene Populin ab und entzog dem Filtrat das noch gelöste Populin durch Ausschütteln mit Aether. Der Aetherrest und der Niederschlag wurden mit Salzsäure gekocht und die gebildete Menge Glukose auf Populin berechnet.

Weil ja eine derartige, zum Teil auf das Auskristallisieren des Populins gestützte Methode, eben an sich etwas Missliches hat, und das Ausschütteln mit Aether auch Schwierigkeiten bot, suchte ich eine andere Bestimmungsmethode, fand dabei jedoch erhebliche Schwierigkeiten.

Das Handelsemulsin spaltet Populin nicht und ebenso wenig Hefe-emulsin, dagegen fanden Bourquelot und Herissey, ²⁾ dass das Emulsin des *Aspergillus niger* auch Populin hydrolysieren kann. Ich bereitete daher ein Rohenzymgemisch aus diesem Pilz, indem ich ihn in Raulinscher Flüssigkeit bei 35° C. züchtete und vor der Sporenbildung die Kulturen im Mörser zerrieb; den Brei liess ich drei Tage mit einigen Tropfen Chloroform stehen, presste denselben aus durch Planktongaze und filtrierte den Presssaft. Dieser Saft mit 96 prozentigem Alkohol versetzt gab einen weissen Niederschlag, der vom Alkohol abfiltriert, mit Alkohol gewaschen und zuletzt in Wasser gelöst wurde. So erhielt ich eine klare, farblose, die Feh-

1) Diese Bestimmungen waren jedoch durch die fehlerhafte Methode nicht zuverlässig, sodass sie für das Studium der physiologischen Bedeutung des Populins wertlos sind.

2) Bourquelot et Herissey. Sur les propriétés de l'emulsine des Champignons. Compt. Rend. CXXI.

lingsche Lösung nur sehr schwach reduzierende Flüssigkeit, die mehrere Enzyme enthielt.¹⁾

Zunächst prüfte ich die Wirkung auf Populin.

Die Versuche geschahen stets bei einer Temperatur von $\pm 40^\circ \text{C}$.

Nach einem Tage war von 100 mg. Populin 82%, bei anderen Versuchen nach drei Tagen 97% und 99% des Populins gespalten. Diese Spaltung wurde gemessen mittels der gebildeten Glukose (von der zugefügten Enzymlösung war die Glukosequantität bekannt). Überdies wurde am Ende des Versuchs die Flüssigkeit mit Aether ausgeschüttelt, im Aetherextrakte war dann Saligenin (siehe oben) und Benzoesäure nachzuweisen.

Zur Identifizierung der Benzoesäure wurde der Aetherextrakt sublimiert; der Beschlag gab das charakteristische Bleisalz und Silbersalz²⁾ und mit Ammonia neutralisiert erhielt ich nach Einengen der Lösung und Hinzufügung von Wasser und eine Spur Ferrichloridlösung den isabellfarbigen Niederschlag.

Das Rohenzym aus *Aspergillus niger* spaltet jedoch auch ganz vorzüglich Salicin, Maltose und Saccharose, enthält daher Emulsin, Maltose und Invertin, wie diesbezügliche Versuche zeigten.

Wenn man darum das Rohenzym zur Populinbestimmung verwenden wollte, musste in folgender Weise verfahren werden: von einem Extrakt, das in der üblichen Weise aus Salixblättern oder Rinde hergestellt war, musste die Glukosequantität nach Inversion mittels des *Aspergillus*-enzymen bestimmt und davon abstrahiert werden:

1) Raciborski. Bull. int. Akad. d. sc. de Cracovie 1905 hat in *Aspergillus* eine Oxydase nachgewiesen, die Jodkalium zu Jodium oxydiert.

2) H. Behrens. Anleitung zur mikrochemischen Analyse.

- 1°. die vorhandene Glukose,
- 2°. die Glukose, welche von Salicinspaltung durch Emulsin,
- 3°. die Glukose, welche von Maltosespaltung durch Maltase,
- 4°. die Glukose (Laevulose) die von Saccharosespaltung durch Invertin herrührt.

Zum Beispiel 500 Blätter *Salix purpurea* L. Trocken
35 g. August '09.

Glukose	629 mg.	1.80 %
Salicin-Glukose 1466 mg.	Salicin 2329 mg.	6.65 %
Saccharose-Glukose (Laevulose) 351 mg.		1.0 %
Maltose-Glukose 500 "		1.43 %
Aspergillus-Glukose 3007 "		
Also 3007 — (629 + 1466 + 351 + 500) = 61 mg.		
Populin-Glukose also 132 mg. Populin 0.38 %.		

Diese Bestimmungsmethode hat jedoch nur Wert, wenn eine relativ sehr bedeutende Quantität Populin vorliegt, denn die Bestimmungsfehler, die bei einer derartigen Enzymspaltung niemals völlig zu vermeiden sind, kumulieren sich bei dem Wert, den man für das Populin berechnet. ¹⁾

Für *Salix purpurea* ist also die Methode ungeeignet, denn der Populingehalt ist klein und zeigt grosse individuelle Schwankungen; einige Exemplare haben Blätter mit einem Gehalt von 1.9 % bis 2 %, in andern fehlt das Glykosid in den erwachsenen Blättern fast ganz.

Stets jedoch tritt das Populin deutlich hervor beim Austreiben im Frühjahr, die jungen Schösslinge enthielten anfangs Mai pro 100 Stück 30 bis 40 mg. Populin, die

1) Das benutzte Emulsin hydrolisiert weder Saccharose noch Maltose, das Invertin weder Salicin noch Maltose, die Maltase nur Maltose. Die Behauptung Marino's und Fiorentino's (Gazzetta 1906), dass Maltase auch Salicin spaltet, trifft für das von mir benutzte Präparat nicht zu.

etiolierten Schösslinge enthalten es durchaus nicht, ebenso wenig wie Saccharose. Diese Tatsache erklärt auch, warum die gefundenen Werte des Verhältnisses zwischen Catechol und Salicin in den etiolierten Schösslingen und deren Zweige so viel mehr wie in den normalen Zweigen mit dem theoretischen Werte (38:100) übereinstimmen.

Beim Austreiben der Zweige, die im Dunkeln in Wasser gestellt werden, verhalten sich Catechol und Salicin wie 36:100, beim Austreiben der Zweige im Freien wie 21:100, verhältnismässig ist die Abnahme des Salicins also zu gross. Die Erklärung liegt auf der Hand; bei letzterem Versuch hat zwar das Salicin stark abgenommen, das Populin hat jedoch in den Schösslingen zugenommen. Populin nämlich ist Benzoylsalicin, eine Ueberführung des einen Glykosides in das andere ist leicht zu erwarten (siehe unten).

Salix purpurea mit seinem grossen Salicin- und kleinen Populingehalt, war also kein geeignetes Objekt zum Studium letzteren Glykosides und deshalb dehnte ich meine Untersuchungen auf die Populusarten aus.

Versuche mit Populus-Arten.

Schon längst ist das Populin in der Rinde und in den Knospen und Blättern von *Populus tremula* L., *P. nigra* L., *P. pyramidalis* Rozier und *P. monilifera* Ait. aufgefunden worden.¹⁾ Neben dem Populin kommt in den meisten Species Salicin vor.

In allen von mir untersuchten Arten *P. alba* L., *P. pyramidalis* Rozier, *P. monilifera* Ait, *P. canadensis* Mchx, *P. balsamifera* L. fand ich bedeutende Quantitäten Catechol, das als das endgültige Spaltungsprodukt des Salicins, aber wahrscheinlich auch des Populins zu betrachten ist.

1) Braconnot. Ann. d. Chim. et de Phys. T. 44. S. 296.

Populin ist Benzoylsalicin, man würde daher vielleicht erwarten Benzoylcatechol als Spaltungsprodukt des Populins zu finden; dies trifft jedoch nicht zu.

Benzoylcatechol löst sich schwierig in kaltem Wasser, gut in heissem Wasser, Alkohol und Aether. Beim Ausschütteln des Warmwasserextraktes der Teile mit Aether musste es also, wenn vorhanden, im Aetherextrakt zu finden sein. Dieser Extrakt wurde daher in heissem Wasser gelöst und der beim Erkalten gebildete Niederschlag auf Benzoylcatechol geprüft. Kein Sublimat war zu erhalten, also kein Benzoylcatechol, denn, weil dieses ja ganz gut sublimiert, hätte man es im Beschlage finden müssen.

In *Populus monilifera* Ait, *P. alba* L. sowie *Salix purpurea* konnte ich also kein Benzoylcatechol nachweisen, das Vorhandensein desselben war aber auch nicht wahrscheinlich, denn aus den Knospen der *Populus monilifera* erhielt ich ein Rohenzymgemisch, das nicht nur Salikase enthielt, sondern auch Populin spaltete, welche Spaltung mir mit dem Rohenzym aus *Salix purpurea* misslang. In *Populus monilifera* liegt demnach noch ein anderes Enzym, das ich Populase nennen möchte, vor. Bei einem Versuch erhielt ich aus 100 mg. Populin, neben Saligenin und Benzoessäure die im Aetherextrakt zu finden waren, ± 12 mg. Glukose, also war 36% des Populins gespalten; bei einem andern Versuch erhielt ich aus 100 mg. Populin ± 25 mg. Benzoessäure, also war 80% des Populins gespalten. Ob bei dieser Spaltung zeitweilig Salicin gebildet wird, konnte ich nicht entscheiden, wahrscheinlich ist es jedoch, denn in einem Falle fand ich nach 24 Stunden

1) Es gelang mir nicht Populase und Salikase zu trennen, sodass die Wirkung der Populase allein auf Salicin nicht geprüft werden konnte.

sehr viel Benzoesäure und nur sehr schwache Reduktion der Fehlingschen Lösung.

Das Populin kann also in der Pflanze leicht in Salicin verwandelt werden, es gelang mir aber nicht, die Benzoesäure in den Teilen zu finden, diese scheint sofort verarbeitet zu werden.

Als erstes Objekt wählte ich *Populus monilifera*, weil nach van Ryn, „die Glykoside“ in den Blättern kein Salicin vorhanden sein sollte.

Populin war in den Blättern vorhanden, obschon es bei den kleinen Quantitäten, die ich zu meinen Versuchen benutzte, aus den Extrakten nicht auskristallisierte. Wurde jedoch der Blätterextrakt durch das Rohenzym aus *Aspergillus niger* gespalten, so war Benzoesäure nachzuweisen.

Salicin war aber ebenfalls anwesend und zwar in ziemlich grosser Quantität und obschon also die Aussicht auf eine genaue Populinbestimmung nicht gross war, untersuchte ich dennoch das Austreiben im Frühjahr und die nächtliche Abfuhr aus den Blättern, leider mit keinem Resultat in Bezug auf das Populin, denn es zeigte sich, dass ein so grosser Saccharosegehalt vorlag, dass von einer Populinbestimmung nicht die Rede sein konnte.

So fand ich im August in den Blättern:

1,1 bis 2 % Glukose, 1,5 bis 2,0 % Salicin, 0,3—0,8 % Maltose
4,8—5,7 % Saccharose , 0,15 bis 0,20 % Populin.

In den Zweigen im Sommer:

1 % Glukose, 1,1 % Salicin, 2 % Maltose, 2 %, Saccharose
± 0,2 % Populin.

Es scheint mir jedoch, dass die Ergebnisse auch für das Studium des Salicins und der Saccharose einigen Wert haben, weshalb ich sie hier mitteilen will.

Versuch mit an den Bäumen austreibenden Zweigen.

27 März. Rinde und Knospen, trocken 70 g. ¹⁾

Catechol	0.02 %	15 mg.
Glukose	1.20 "	838 "
Salicin	1.90 "	1331 "
Saccharose	3.01 "	2106 "

17 Mai. Rinde und junge Schösslinge, trocken 65 g.

Catechol	0.06 %	38 mg.
Glukose	0.90 "	584 "
Salicin	1.99 "	1295 "
Saccharose	1.0 "	658 "

Die Saccharose nimmt also bedeutend ab, 69 % des Ganzen, das Salicin hat nur wenig abgenommen 36 mg., hat prozentisch sogar zugenommen, das Catechol hat um 23 mg. zugenommen.

Bei einem zweiten Versuch mit Zweigen, welche im Dunkeln in Wasser gestellt wurden, Wurzeln entwickelten und ganz gut austrieben, war das Resultat folgendes:

29 März. Vor dem Austreiben, Knospen und Rinde, trocken 30 g.

Catechol	13 mg.	0.04 %
Glukose	224 "	0.74 %
Salicin	595 "	1.98 %
Saccharose	1198 "	4.00 %

16 Mai. Nach dem Austreiben der etiolierten Schösslinge.

Rinde trocken 21 g.

Catechol	34 mg.	0.16 %
Glukose	63 "	0.30 %
Salicin	511 "	2.43 %
Saccharose	80 "	0.38 %

1) Das Holz enthielt im März weder Salicin, noch Saccharose, im Mai kein Salicin aber kleine Quantitäten Saccharose, so klein dass letztere vernachlässigt werden konnten.

Junge etioliierte Schösslinge, trocken 2.6 g.

Catechol	3 mg.	0.12 %
Glukose	53 "	2.04 %
Salicin	50 "	1.92 %
Saccharose Spuren.		

Zusammen.	Catechol	37 mg.
	Glukose	116 "
	Salicin	560 "
	Saccharose	80 "

Hier hatte die Saccharose noch viel stärker abgenommen, das Salicin war um 35 mg. abgenommen, das Catechol um 24 mg. zugenommen.

Die Abnahme des Salicins ist in beiden Fällen klein und sofort erregt es die Aufmerksamkeit, dass das Verhältnis der Abnahme des Salicins und der Zunahme des Catechols ganz verschieden ist von dem bei *Salix purpurea*.

Beim normalen Austreiben ist das Verhältnis 64:100, beim Austreiben in Wasser gestellter Zweige im Dunkeln 66:100, während der theoretische Wert 38:100 ist. Die Zunahme des Catechols ist also grösser als nach der Abnahme des Salicins zu erwarten wäre. Ich meine diese Tatsache dadurch erklären zu können, dass das Populin ebenfalls gespalten wird und bei der Spaltung, welche vielleicht das Salicin als Zwischenprodukt liefert, auch Catechol das Endprodukt ist¹⁾. Leider war eine genaue Populinbestimmung hier nicht möglich, sodass die Annahme nicht kontrolliert werden konnte.

1) Das aus den Knospen erhaltene Rohenzym enthielt, ebenso wie bei *Salix purpurea* Katalase. Zu derartigen Versuchen mit Catechol und Saligenin wie bei *Salix purpurea* eignet das Rohenzym sich nicht so gut, weil es nicht so rein erhalten werden konnte und sich selbst überlassen, bald an der Luft sich bräunte. Beim Zusatz von H_2O_2 wird die Guajakemulsion gebläut.

Ich beobachtete hier in Bezug auf das Populin wieder dasselbe Verhalten, wie bei *Salix purpurea*, die etiolierten Schösslinge enthielten zwar Salicin, aber kein Populin, im Gegensatz zu den normalen grünen Schösslingen, wo beide vorlagen; ebenfalls war Saccharose in den etiolierten Schösslingen nicht vorhanden.

In den ruhenden Knospen ist nur Salicin, kein Populin oder Saccharose zu finden. Beim Austreiben erscheinen vorübergehend auch Spuren Saligenin. Benzoessäure konnte ich niemals auffinden.

Ich hatte nur die Gelegenheit fast reife männliche Kätzchen, keine weiblichen zu analysieren, fand in ersteren pro 100 Kätzchen:

19 mg.	Catechol	0.11 %
525 "	Glukose	3.09 %
65 "	Salicin	0.38 %
511 "	Saccharose	3.— %

Jetzt noch einige Betrachtungen über den Rohrzucker, dem man früher keine allgemeine Bedeutung zuschrieb, der jedoch durch spätere Untersuchungen mehr in den Vordergrund getreten ist.

Früher kannte man gewissermassen nur die Saccharose beim Zuckerrohr, bei der Zuckerrübe und in einigen anderen Pflanzen, wo sie ebenfalls als Reservestoff zu betrachten war. Nachher haben Schulze und Frankfort¹⁾ mittels der Fällung durch Strontianhydroxyd und hat Bourquelot²⁾ mit Hülfe der Invertinspaltung und durch Beobachtung der Rotation das Vorhandensein der Saccharose in sehr vielen Pflanzenarten, ja in fast allen

1) Schulze und Frankfort. Zeitschrift physiol. Chem. Bd. XX.

2) Bourquelot, Em. Le sucre de canne dans les végétaux. Journ. d. Pharm. et de Chim. 1903.

Keimpflanzen und auch in den Blättern z.B. der Kirsche Birne, Erle, Hasel ¹⁾ nachgewiesen. In 1893 haben Brown und Morris ²⁾ durch ihre eingehenden Versuche mit *Tropaeolum* gezeigt, dass die Saccharose bei der Assimilation eine wichtige Rolle spielen kann; sie behaupten sogar dass der ganze erworbene Kohlenstoff zunächst in Rohrzucker übergeführt werde, welche Behauptung jedenfalls noch nicht bewiesen ist. Gewiss nimmt in den Blättern von *Tropaeolum* und von *Beta vulgaris* L. ³⁾ am Tage die Saccharosequantität zu und nimmt während der Nacht ab, der Rohrzucker ist demnach als ein Reservestoff zu betrachten, der bei der Assimilation vorübergehend gespeichert werden kann, weil der Transport der Assimilate nicht so schnell vor sich geht wie die Bildung.

Hier bei *Populus monilifera* ist, wie das Retragen im Frühjahr zeigt, der Rohrzucker ebenfalls als ein Reservestoff zu betrachten, der beim Austreiben benutzt wird und auch sein Verhalten in den Blättern schliesst sich dem von Brown und Morris bei *Tropaeolum* Beobachteten an.

August 1908 33 halbierte Blatthälften Abends 8 Uhr.

Catechol	13 mg.
Glukose	36 "
Salicin	152 "
Saccharose	275 "

Kontrollversuch am folgenden Morgen.

Catechol	19 mg.
Glukose	37 "
Salicin	127 "
Saccharose	180 "

1) Lippmann. Chemie der Zuckerarten.

2) Brown und Morris. Journ of the Chem. Society. 1893.

3) Gerard. Compt. Rend. T. XCVII.

Die Saccharose hat also während der Nacht um 35 % (in einem andern Versuche um 32 %) abgenommen, das Salicin um 16 % abgenommen, das Catechol zugenommen; die Zunahme des Catechols verhält sich zu der Abnahme des Salicins wie 24 : 100. Die Beobachtungen an *Populus monilifera* bestätigen also das in Bezug auf Salicin und Catechol bei *Salix purpurea* Gesagte.

Aus den jungen Schösslingen von *Populus monilifera* erhielt ich in derselben Weise wie oben ein Rohenzymgemisch, das Invertin, Maltase, Salikase, ein Populinspaltendes Enzym, Populase, überdies Katalase, und wahrscheinlich Catecholase und Saligeninase enthielt. Butkewitsch¹⁾ fand in der Rinde viel Diastase; auch hier also lenkt²⁾ eine stattliche Zahl Enzyme den Stoffwechsel, gerade so wie Shibata³⁾ für wachsende Bambusschösslinge beobachtete und Went⁴⁾ z.B. für *Monilia sitophila* nachwies.

Einige Bestimmungen der Blätter von *Populus canescens* Sm. und *Populus alba* L. ergaben auch dort das Vorhandensein von Salicin, Populin und Saccharose; das Populin kristallisiert zwar leichter aus den Extrakten aus, aber der Gehalt ist ebenfalls klein, sodass diese Arten sich ebenso wenig zum Studium der Bedeutung des Populins eigneten. Bessere Resultate versprach *Populus tremula* L., weil nach Van Ryn, „die Glykoside“, das Populin daraus bereitet wird. In der Rinde fand ich jedoch nur Spuren Populin im Herbst. In den Blättern war der Populingehalt, obschon grösser als bei den übrigen Species (0,3—0,5 %),

1) Auf Eiweiss spaltende Enzyme habe ich das Rohenzym nicht untersucht.

2) W. Butkewitsch. Biochem Zeitsch. X. 1908.

3) K. Shibata. Bot. Mag. Vol. XVII.

4) F. A. F. C. Went. Jahrb. Wiss. Botanik. Bd. XXXVI.

dennoch klein in Bezug auf den Salicingehalt (2%) und den Saccharosegehalt (5%), sodass die Bestimmung mit dem Aspergillusenzym keine genaue Resultate gab.

Die Saccharose verhielt sich hier ganz wie bei *Populus monilifera*, ebenfalls das Salicin; ersterer Stoff nahm während der Nacht um 20% ab, letzterer um 25%. Das Catechol nahm zu; eine genaue Bestimmung war jedoch durch anwesendes Harz unmöglich. Im Allgemeinen bestätigen also diese Ergebnisse das bei *Salix purpurea* Gesagte.

ZUSAMMENFASSUNG DER RESULTATE.

1. Das Arbutin ist bei *Vaccinium* *Vitis idaea* als ein Reservestoff zu betrachten, der hauptsächlich in den Blättern lokalisiert ist und beim Austreiben der jungen Schösslinge im Frühjahr benutzt wird.
2. Diesem Verbrauch geht eine Spaltung mittels eines Enzyms voran; bei dieser Spaltung werden Hydrochinon und Glukose gebildet. Ersteres bleibt zum Teil in den alten Blättern und jungen Teilen gespeichert und wird wieder zu Arbutin zurück gebildet, wenn die Assimilation anfängt, zum Teil wird es sofort beim Entstehen im Stoffwechsel weiter abgebaut. Im Herbst ist kein freies Hydrochinon in den Blättern vorhanden.
3. *Pirus communis* enthält nur kleine, sehr wechselnde Quantitäten Hydrochinon, jedoch verhältnismässig viel grössere Mengen eines Hydrochinonglykosides, das wahrscheinlich mit Arbutin identisch ist. Dieses Glykosid spielt ebenfalls die Rolle eines Reservestoffs, der in den Blättern gebildet und in der Rinde, weniger im Holze der oberirdischen Zweige aufgespeichert wird.
4. Beim Austreiben im Frühjahr wird das Glykosid konsumiert, nach vorhergehender Spaltung mittels eines Enzyms. Das aromatische Spaltungsprodukt, Hydrochinon, bleibt während einiger Zeit beim Austreiben völlig gespeichert; die Zunahme des Hydrochinons

verhält sich also zu der Abnahme des Arbutins wie die Molekulargewichte. Nach dem Anfang der Assimilation nimmt das Hydrochinon schnell ab, das Arbutin zu und bildet Hydrochinon aus dem Transportstoff Glukose den Revertstoff Arbutin.

5. Aus den jungen Schösslingen von *Salix purpurea* L. und *Populus monilifera* Ait. erhielt ich ein Rohenzymgemisch, das Salicin in Glukose und Saligenin spaltet. Einige Versuche deuten auf eine reversible Wirkung hin.
6. In jungen Schösslingen und in der *Salix*-Rinde, die dieses Enzym, Salikase enthielten und wo das Salicin in Abnahme begriffen war, konnte ich dennoch oft kein Saligenin nachweisen, ein neuer Beleg für die schnelle Umwandlung des Saligenins, wobei nach zahlreichen Versuchen Catechol das Endprodukt bildet.
7. Beim Austreiben im Frühling erscheinen während einiger Tage ziemlich grosse Quantitäten Saligenin in den jungen Schösslingen und Kätzchen ¹⁾ und fehlt das Catechol fast völlig. Innerhalb einiger Tage ändert sich der Zustand gänzlich, Saligenin verschwindet wieder, Catechol tritt schnell auf. Die Rinde zeigt diesen Saligeningehalt nie.
8. Das aus den *Salix purpurea* Knospen erhaltene Rohenzymgemisch enthielt nebst Salikase und Katalase, zwei spezifische Oxydationsenzyme, welche von Lakase und Tyrosinase verschieden sind. ²⁾ Sie wurden, ihren charakteristischen Reaktionen gemäss mit den Namen Saligeninase und Catecholase belegt. Beide sind durch Erhitzen zu trennen, denn bei 85° C. war die Saligeninase zerstört, die Catecholase jedoch nicht.

1) Nur männliche Kätzchen wurden untersucht.

2) Ebenfalls sind sie von den Oxydasen aus Bierhefe und Gerstenmalz verschieden.

Letztere zersetzt das Catechol unter Bildung eines schwarzen, in Wasser fast unlöslichen, amorphen Stoffes und hat keine Wirkung auf Saligenin. Beide zusammen bilden dem Anschein nach, aus Saligenin dasselbe Endprodukt wie die Catecholase aus Catechol. Die Annahme liegt also auf der Hand, dass die Saligeninase aus Saligenin Catechol bilde. Diese Oxydationsspaltung des Salicylalkohols ist also von einer Oxydation im Laboratorium, wobei stets Salicylsäure entsteht, durchaus verschieden.

In den lebenden Geweben scheint also die Catecholase räumlich von dem Catechol getrennt zu sein, sodass die Bildung des schwarzen Stoffes nur bei Nekrobiose hervortreten kann, die Saligeninase dagegen ist vom Saligenin nicht räumlich getrennt, sodass die Catecholbildung erfolgen muss.

9. Die Abnahme des Salicins und die Zunahme des Catechols verhalten sich beim Austreiben der im Dunkeln in Wasser gestellten Zweige fast wie die Molekulargewichte (100:36). Beim Austreiben an der Pflanze im Freien ist das Verhältnis weit mehr vom theoretischen Wert verschieden (100:21). Die Abnahme des Salicins ist verhältnismässig zu gross, was meiner Meinung nach, zum Teil durch die Populinbildung auf Kosten des Salicins erklärt wird. In den grünen, jungen Schösslingen nämlich ist viel Populin, in den etiolierten gar keines.
10. Im ganzen Sommer wird das Salicin tagsüber in den Blättern gebildet, in der Nacht zum Teil gespalten und die Glukose nach der Rinde transportiert, während das zurückgebliebene Catechol am folgenden Tage wieder neue Glukose zu Salicin bindet. Kommt jedoch im Herbst der Salicingehalt in der Rinde dem in den Blättern gleich, so wird der Transport gehemmt, die

nächtliche Salicinabnahme und Catecholzunahme halten ein.

11. Der Populingehalt tritt in den Blättern und in der Rinde von *Salix purpurea* gegenüber den Salicingehalt sehr zurück, und zeigt grosse individuelle Schwankungen; die ausgearbeitete Bestimmungsmethode gab daher keine zuverlässige Ergebnisse in Bezug auf die physiologische Bedeutung des Populins.
12. Ebenso war dies der Fall bei *Populus monilifera* Ait. und *Populus tremula* L. Das Salicin und Catechol verhalten sich hier im Grossen und Ganzen wie bei *Salix purpurea*; das Austreiben der Knospen untersuchte ich bei *P. monilifera* und fand hier die Zunahme des Catechols im Verhältnis zu der Abnahme des Salicins zu gross (61:100). Diese Tatsache ist dadurch zu erklären, dass das Catechol ebenfalls das Endprodukt der Populinspaltung ist. Ich erhielt nämlich aus diesem Objekt nebst Salikase noch ein anderes Enzym, die Populase, die Benzoessäure vom Populin (Benzoylsalicin) abspaltet, sodass Saligenin- und Catechobil- dung leicht aus Populin stattfinden kann. Im Roh- enzym der Knospen fand ich überdies Katalase, wahrscheinlich Saligeninase und Catecholase.

Etiolierte Schösslinge enthielten lediglich Salicin, kein Populin, normale Schösslinge beide Glykoside ebenso wie bei *Salix purpurea*.

13. Saccharose wurde bei *Salix purpurea* L., *Populus alba* L., *Populus monilifera* Ait., *Populus tremula* L. nachgewiesen, bei den drei letzteren in grossen Quantitäten.

Der Rohrzucker bildet in der Rinde einen Reservestoff, der beim Austreiben verbraucht wird. In den Blättern wird er am Tage gespeichert, nimmt jedoch während der Nacht in diesen Teilen ab und häuft

sich in der Rinde an. Aus den jungen Schösslingen erhielt ich auch Invertin.

14. Die Versuche mit *Vaccinium* *Vitis idaea* L., *Pirus communis* L., *Salix purpurea* L., *Populus monilifera* Ait. und *Populus tremula* L. bestätigen also die Hypothese, dass die Verbindungen der Benzolderivate mit Kohlenhydraten zur Bildung schwer diosmierender Stoffe dienen, die sich zur Aufspeicherung der Zucker in den Zellen eignen.

AMERSFOORT, August 1909.

NACHTRAG.

Nachdem ich meine Arbeit schon abgeschlossen hatte, erhielt ich Einsicht von zwei neuen Mitteilungen ¹⁾ auf dem Gebiete der Oxydasen, welche Mitteilungen sich bemühen den Enzymcharakter der Lakkase in Abrede zu stellen. Obschon die obenerwähnten Salixoxydasen von Lakkase durchaus verschieden sind, schien es mir doch erwünscht, diese Untersuchungen eingehend zu betrachten, ins besondere weil Dony-Hénault seine Betrachtungen auch auf andere Oxydasen ausdehnt. Schon Bertrand, der Entdecker der Lakkase hat auf den Mangangehalt der Rhus-Lakkase gewiesen und gezeigt, dass das Mangan bei der Oxydation des Hydrochinons zum Beispiel eine bedeutende Rolle spielt. Ebenfalls stellte Bertrand fest, dass die Lakkase gegen kleine Zusätze von Säuren sehr empfindlich ist und schloss aus diesen Beobachtungen, dass die Rhus-Lakkase ein Enzym ist, dem die Formel Mn. R. zukommt, in welcher Formel R. eine sehr schwache organische Säure darstellt, vielleicht von proteidem Charakter.

Trillat ²⁾ behauptet, dass aromatische Stoffe in eiweiss-haltigen Lösungen, durch kleine Mengen von Mangansalzen, bei schwach alkalischer Reaktion schnell oxydiert werden. Dony-Hénault stellte nun ein gewissermassen, künstliches Enzym dar, indem er 25 g. arabisches Gummi, 3 g. Manganformiat, 2 g. Natriumkarbonat und 10 gr. Seignet-

1) O. Dony-Hénault. Contribution à l'étude méthodique des oxydases. Bull. de l'Acad. roy. de Belgique 1908 und 1909.

Hans Euler und Ivan Bolin. Zur Kenntniss biologisch wichtiger Oxydationen. Hoppe Seylers Zeitschr. f. physiol. chemie 1908.

2) A. Trillat. Compt. R. 1903, S. auch Czapek Biochemie der Pflanzen.

tesalz in 300 c.c. Wasser löste, die Lösung durch Glaswolle filtrierte, mit Alkohol versetzte und den mit Alkohol gewaschenen Niederschlag wieder in Wasser löste. Dies wurde noch einmal wiederholt und der erhaltene Niederschlag bestand hauptsächlich aus Gummi, enthielt jedoch Mangan und war schwach alkalisch, die Salze werden also bei der Alkoholfällung der Kolloide mitgerissen.

Die also erhaltene, künstliche Enzymlösung zeigte die Reaktion mit Guajakemulsion (Bläuung ohne Hinzufügung von H_2O_2) und oxydierte Hydrochinon zu Chinhydron.¹⁾

Nach den Beobachtungen Trillat's ist dies nicht überraschend, weil ja Mangansalze anwesend sind und die Reaktion alkalisch ist; Dony-Hénault schliesst hieraus jedoch, dass die Lakkase nicht in der Pflanze präformiert zu sein brauche. Dieser Autor hat auch sehr eingehend untersucht, dass zwar Mangansalze allein einen fördernden Einfluss auf die Hydrochinonoxydation haben, und ebenfalls die Hydroxylionen, dass die Wirkung beider Faktoren kombiniert jedoch viel grösser ist, als aus einer einfachen Addierung beider Wirkungen hervorgehen würde.²⁾ Die Hydroxylionen üben entscheidend kräftiger Wirkung aus und ihre Konzentration braucht daher nur ausserordentlich schwach zu sein. Die Hinzufügung von Seignettesalz macht die Wirkung gegenüber Guajakemulsion, welche sonst schwach bleibt, viel stärker, wahrscheinlich weil das Salz die Ausfällung der Mangansalze durch das Alkali verhindert.

Eigentümlich ist es auch, dass ein derartig angefertigtes Enzym gegen Erwärmen bis auf 100 C. empfindlich ist,

1) Das künstliche Enzym gab die Guajakolreaktion nicht. Dony-Hénault zeigte jedoch, dass diese nicht von Mangansalzen, sondern von Eisensalzen mit Hydroxylionen kombiniert, hervorgerufen wird.

2) Dies erinnert an das Verhalten von Enzymen in Bezug auf ihre Ko-Enzyme.

dann wird *seine Wirkung sehr geschwächt, obschon nicht vernichtet*. (Nach 15' auf 100° C. verursachte das Enzym noch eine sehr deutliche Hydrochinonoxydation und schwache Bläuung der Guajakemulsion).

Wenn der Autor daher sagt: „Il y a lieu de considérer comme purement fantaisiste et dénué de tout fondement expérimental réel, la conception de la nature diastasique de la laccase. La laccase n'existe pas dans les arbres à laque. C'est une création accidentelle de la précipitation alcoolique,“ so scheint mir dieser Schluss doch etwas verfrüht; es ist noch nicht bewiesen, dass die Wirkung der Lakkase ausschliesslich von dem darin anwesenden Mangan und den freien Hydroxylionen verursacht wird, weil ein künstliches Präparat eine ähnliche Wirkung hervorrufen kann.

Bertrand glaubt den organischen Bestandteil der Lakkase auch in andern Pflanzen z. B. *Medicago sativa* gefunden zu haben und er nannte diesen Stoff ebenfalls Lakkase. Euler und Bolin haben dieser Lakkase, welche an und für sich keine Oxydation des Hydrochinons hervorrufen kann, Mangalsalze hinzugefügt. Es zeigte sich, dass die Lakkase den Oxydationsverlauf beschleunigt und dass sehr schwach saure Präparate (Indikator Phenolphthalein) ebenfalls Hydrochinon oxydierten im Gegensatz zu den Betrachtungen Dony-Hénault's.

Uebersdies wurde die untersuchte Lakkase durch Kochen ihrer Lösung nicht geschwächt, sodass sie zwar einen Katalysator enthält, aber kein Anlass besteht, die Lakkase vom *Medicagotypus* zu den Enzymen zu rechnen. Diese *Medicago*-Lakkase enthielt jedoch organische Säuren, deren Natriumsalze die Oxydation des Hydrochinons in noch höherem Grade beschleunigen.¹⁾

1) Dony-Hénault behauptet dagegen, dass diese Natriumsalze der schwachen organischen Säuren freie Hydroxylionen ent-

Mich interessierte natürlich am meisten, wie sich einerseits das künstliche Enzym von Dony-Hénault gegenüber Catechol verhalte und andererseits, ob die obenstehenden Betrachtungen auch für die Salixoxydase zutreffen würden.

Wenn ich nach den Vorschriften Dony-Hénault's die Lakkase anfertigte, so erhielt ich ein Präparat, das mit Guajak und Hydrochinon vorzüglich reagierte, jedoch eine Catechollösung nach 24 Stunden nur sehr schwach, und eine Saligeninlösung gar nicht färbte, sodass die künstliche Lakkase in ihrer Wirkung durchaus von der Catecholase und Saligeninase verschieden ist.¹⁾

Auch prüfte ich das gesammte Rohenzym aus *Salix purpurea*, denn eine Trennung war ja unmöglich, auf Mangan. Dabei benutzte ich die Bildung der blaugrünen Perle: wenn man nämlich manganhaltige Salze mit wasserfreiem Natriumkarbonat am Ohr eines Platindrahtes zusammenschmilzt, so entsteht nach dem Erkalten eine blaugrün gefärbte Perle, deren Färbung in der reduzierenden Lötrohrflamme verschwindet, beim Einbringen in die oxydierende Lötrohrflamme wieder zum Vorschein kommt.

Das Rohenzym aus *Salix purpurea* zeigt die Manganreaktion *nicht*.

Die Reaktion der Rohenzymlösung war mit Lakmuspapier neutral, mit Rosolsäure schwach alkalisch; besonders schwach bei dem Rohenzym aus den jungen Teilen, dem die kräftigste Wirkung zukommt. Die obenerwähnten

halten, worauf die Wirkung zurückgeführt werden könnte, während Phenolphthalein hier als Indikator untauglich sei.

1) Natriumkarbonat z. B. färbt eine Catechollösung schnell grün, dann braunschwarz; m. a. W. Hydroxylionen üben eine starke oxydierende Wirkung auf Catechol aus.

Reaktionen des Rohenzymys mit Saligenin, Catechol u. s. w. wurden also in sehr schwach alkalischer Lösung zu Stande gebracht, aber diese Gegenwart freier Hydroxylionen ist keine unerlässliche Bedingung, wie aus Folgendem hervorgeht.

Die Rohenzymlösung wurde mit Spuren HCl versetzt, bis die Flüssigkeit mit Lakmuspapier und Rosolsäure schwach sauer reagierte, dann zeigte sie die Reaktion mit Catechol dennoch ganz vorzüglich. So war auch der aus den alten Blättern ausgepresste Saft deutlich sauer (Lakmuspapier), und gab eine schnelle Schwarzfärbung des Catechols. Fügt man der Enzymlösung jedoch mehr Salzsäure hinzu, so wird die Oxydation sehr stark verzögert und gehemmt.

Die Betrachtungen Dony-Hénault's haben deshalb hier keine Gültigkeit, weder für die Catecholase, noch für die Saligeninase, denn Mangan ist abwesend und die Anwesenheit freier Hydroxylionen wirkt zwar fördernd, ist jedoch kein Erforderniss.

Darauf deutet schon der Umstand hin, dass die Guajakreaktion, welche von der Kombination freier Hydroxylionen mit Mangansalzen so stark hervorgerufen wird, hier durchaus nicht eintritt.¹⁾

Die Rohenzymlösung färbt eine Salicylsäurelösung nicht, das deutet darauf hin, dass ebensowenig wie Manganionen, hier Eisenionen anwesend seien.²⁾

1) Ein Beweis ist dies freilich nicht, denn schon Schönbein beobachtete, dass Gerbstoffe z. B. auf die Guajakbläuung hemmend wirken.

2) In der Asche der kleinen Quantität des Rohenzymys (aus jungen Teilen denn aus erwachsenen ist es nicht so rein), worüber ich im Herbst verfügen konnte, war mittelst der Reaktion mit Ferrocyankalium ebensowenig Eisen nachzuweisen.

Es schien mir nun auch erwünscht zu prüfen, wie sich das System Hydroperoxyd-peroxydase, das von Chodat mit der Lakkase verglichen, ja fast identifiziert worden ist, verhalte ¹⁾. Die Peroxydase erhielt ich aus dem Meerrettig, durch Abschaben und Auspressen. Der Presssaft wurde mit Alcohol versetzt und der Niederschlag mit Alcohol ausgewaschen, zuletzt in Wasser gelöst. Diese Lösung oxydierte, nach Hinzufügung von Wasserstoff-superoxyd Guajak und Catechol energisch, gab eine sogar stürmische Reaktion mit Hydrochinon, war jedoch deutlich sauer (Indikator Lakmus, Lakmoid und Rosolsäure) und gab keine Manganperle. Hier treffen also die Betrachtungen Dony-Hénault's ebensowenig zu.

Ebenfalls stellte ich ein Enzym aus *Russula emetica* Fr. in derselben Weise dar. Dies oxydierte schnell Tyrosin (enthielt also Tyrosinase, was bei den andern nicht der Fall war), bildete aus Hydrochinon viel Chinhydron, bläute schnell ohne H_2O_2 die Guajakemulsion und färbte eine Catechollösung zuerst gelb, später braunschwarz.

Eine Saligininlösung blieb völlig unverändert.

Hier war die Reaktion mit Rosolsäure alkalisch und war deutlich Mangan anwesend, sodass die Übereinstimmung mit der Lakkase gross ist.

Zuletzt das Rohenzym aus *Populus monilifera* Ait. Dies schliesst sich in seinem Betragen in mancher Hinsicht mehr dem *Russula*-enzym als dem *Salix*-enzym an, denn obschon es Tyrosin nicht oxydiert, giebt es eine deutliche Reaktion mit Guajak (ohne Hinzufügung von H_2O_2) enthält Mangan und ist mit Rosolsäure deutlich alkalisch.

Was können wir nun hieraus schliessen? Zunächst, dass die Beobachtungen von Dony-Hénault und Euler-Bolin

1) Ueber die Rhus-Lakkase verfügte ich ebensowenig wie Dony-Hénault.

nicht für unsren Fall der Salixoxydase zutreffen und ebensowenig für die Peroxydase aus dem Meerrettig, obschon damit durchaus nicht gesagt worden ist, dass sich die Wirkung der Oxydase nie auf derartige Weise wird erklären lassen. Die kühnen Betrachtungen Dony-Hénault's der, in Anschluss an Euler und gewissermassen auch an van 't Hoff, sich den so rätselhaften Begriff der Enzyme durch die katalytische Wirkung freier Hydroxylionen oder Wasserstoffionen zu erklären sucht, haben etwas sehr Bestechendes.

AMERSFOORT, September 1909.

INHALTSUEBERSICHT.

	Seite.
Einleitung	1
Hydrochinon-Glykoside	2
Versuche mit <i>Salix purpurea</i> L.	21
Das Populin der <i>Salix purpurea</i> L.	37
Versuche mit <i>Populus</i> species	41
Zusammenfassung der Resultate	50
Nachtrag	55