

hitzen der wässrigen Lösung wie Eiweiss gallertig sich ausscheidet, vermutete ich, dass es auch gegen die aussalzende Wirkung des Ammonsulfates sich wie Eiweiss verhalten werde. Diese Vermutung erwies sich als richtig: Das Condurangin lässt sich durch Ammonsulfatlösung sehr bequem aussalzen. Auch die Saponinsubstanzen erinnern durch die leichte Aussalzbarekeit an Eiweissstoffe, mit denen sie ja auch das Schäumen der Lösungen und den kolloiden Charakter gemeinsam haben. Wie Fr. Hofmeister auf die verschiedenen Mengen von Ammonsulfat, welche zum Aussalzen der einzelnen Eiweissstoffe nötig sind, Nachweis- und Trennungsmethoden der einzelnen Eiweissstoffe gegründet hat, so kann man dies auch bei den Saponinsubstanzen tun. Die andern Glykoside und die Alkaloide lassen sich durch Ammonsulfatlösung keineswegs in analoger Weise ausfällen. So gab z. B. kaltgesättigte Phloridzinlösung und Koniferinlösung selbst mit der fünffachen Menge von Ammonsulfatlösung keinen Niederschlag. Auch eine 10%ige Lösung von Chininum bimuriaticum wurde bei Zusatz des gleichen Volumens von gesätt. Ammonsulfatlösung nicht im mindesten verändert, ja selbst nicht bei Zusatz des doppelten, dreifachen und vierfachen Volumens. Eine 4%ige Lösung von salzsaurem Morphin blieb klar, selbst wenn die zugesetzte Menge von Ammonsulfat das 15fache Volumen betrug. Dass man durch Sättigen von Alkaloid- und Glykosidlösungen mit Ammonsulfat in Substanz Fällungen bewirken kann, hat gar kein Interesse für mich, denn bei allen vorstehenden Versuchen handelt es sich ausschliesslich um Gemische, in welchen das Ammonsulfat allerhöchstens bis zur halben Sättigung vorhanden ist. Bei so geringer Sättigung fallen eben nur ganz bestimmte Stoffe, und zwar ganz besonders leicht viele Saponinsubstanzen aus.

---

### III. Ueber das Verhalten der Saponinsubstanzen zu einigen Farbstoffen.

Ueber das Verhalten der sauren Saponine zu Congo-rot habe ich schon S. 8 gesprochen. Einen analogen Farbumschlag zeigen auch Alizarinorange und Alizarinrot, wenn sie als schwach alkalische Lösungen zugesetzt werden; sie ver-

lieren durch die sauren Glykoside ihre rote Farbe. Im Nachstehenden will ich jedoch davon nicht reden, sondern von etwas ganz anderem. Wie ich im Vorstehenden schon mehrfach erwähnt habe, reissen die durch ges. Ammonsulfatlösung fällbaren Saponinsubstanzen beim Niederfallen die etwa in der Lösung vorhandenen Farbstoffe der Mutterdroge (Wurzelfarbstoff bei der Polygalasäure, Rindenfarbstoff bei Quillajasäure) mit nieder. Es schien mir von Interesse festzustellen, ob auch fremde der Lösung zugesetzte Farbstoffe in gleicher Weise mit niedergerissen werden, und zwar, ob dies Niederreißen selbst dann noch erfolgt, wenn die zugesetzten Farbstoffe nicht wie die der Quillajarinde und der Senegawurzel saurer Natur sind.

1. Methylenblau und Guajaksaponinsäure. 1%ige wässrige Lösung von Methylenblau wird an sich, wie ich feststellte, durch die hier in Betracht kommenden Mengen von Ammonsulfatlösung nicht ausgefällt. Färbte ich aber 5 ccm gesättigte Lösung von guajaksaponinsaurem Ammonium mittelst 2–3 Tropfen 1%iger Methylenblaulösung tiefblau und setzte nun vorsichtig ges. Ammonsulfatlösung zu bis das Glykosid völlig ausgefällt worden war, und filtrierte, so erhielt ich ein farbloses Filtrat und einen tiefblauen Filtrerrückstand.

2. Methylenblau und neutrales Guajaksaponin. 5 ccm der 10%igen Lösung des Glykosides werden wie bei 1. behandelt und liefern ein farbloses Filtrat und einen tiefblauen Filtrerrückstand. Waschen mit Ammonsulfat ändert daran nichts.

3. Methylenblau und Helleborein, letzteres 10%ig. Anordnung wie bei 1. Erfolg: farbloses Filtrat und tiefblauer Filtrerrückstand.

4. Methylenblau und Helleborein, letzteres 5%ig. Erfolg wie bei 3.

5. Neutralrot und Helleborein, letzteres 5%ig, von ersterem so viel Tropfen der 1%igen Lösung, um intensive Rotfärbung des Gemisches zu erzielen. Das Ammonsulfat wird nur in solcher Menge zugesetzt, wie sie erforderlich ist um das Glykosid zu fällen. Erfolg: farbloses Filtrat und tiefer Niederschlag, der trotz Waschen mit weiterem Ammonsulfat seine Farbe beibehält.

6. Neutralrot und Quillajasäure, letztere als 5%ige

Lösung des Natriumsalzes. Sonst alles wie bei 5. Erfolg: farbloses Filtrat und tieferer Niederschlag.

7. Methylviolett und Quillajasäure. Mengenverhältnis wie bei 6. Erfolg: farbloses Filtrat und tiefgefärbter Niederschlag auf dem Filter.

8. Methylviolett und Helleborein. Erfolg: farbloses Filtrat und intensiv gefärbter Filtrerrückstand.

9. Cyanin und Helleborein. Da Cyaninlösung an sich mit Helleborein sich sofort entfärbt, wird ein Tropfen Blausäure zugesetzt. Ich fand nämlich bei Gelegenheit meiner Studien über den Nachweis der Blausäure<sup>1)</sup>, dass entfärbte Cyaninlösungen durch Blausäure selbst in sehr geringen Mengen wieder gebläut werden. Die durch Ammonsulfatlösung herbeigeführte Fällung des dunkelblauen Gemisches ergab ein farbloses Filtrat und einen tiefblauen Filtrerrückstand.

10. Aplysienfarbstoff und Quillajasäure. Fasst man die *Aplysia limacina* energisch an, so lässt sie leicht einen intensiv violett gefärbten Saft von sich, der einem eigenartigen Farbstoffe seine Färbung verdankt und durch Ammonsulfatlösung nicht ausfällbar ist. Ich versetzte 5 ccm der mit Natriumkarbonat neutralisierten 5%igen Quillajasäurelösung mit soviel Aplysienfarbstoff, dass das Gemisch intensiv violett war, und fällte alsdann das Glykosid vorsichtig mit ges. Ammonsulfatlösung aus. Ich erhielt ein farbloses Filtrat und einen violetten Filtrerrückstand.

11. Aplysienfarbstoff und Helleborein. 5 ccm der 5%igen Glykosidlösung werden mit Aplysiensaft intensiv violett gefärbt und dann mittelst Ammonsulfatlösung ausgefällt. Ergebnis wie bei 10.

12. Arbacieneierfarbstoff und Guajakblätter- saponin. Eine grosse Menge Arbacieneier werden nach gehörigem Waschen mit Wasser mit schwefelsaurem Alkohol ausgezogen, wobei der Eierfarbstoff mit hochroter Farbe in Lösung geht. Die filtrierte Farbstofflösung wird mit Ammoniak fast völlig neutralisiert, wobei die Farbnuance eine wesentlich dunklere wird. Wasserzusatz bedingt bei einer Probe desselben kein Ausfallen, ebensowenig Zusatz von Ammonsulfatlösung. Das Blättersaponin

<sup>1)</sup> Ueber Cyanmethämoglobin und den Nachweis der Blausäure. Stuttgart 1891.

wird in 5% iger neutralisierter Lösung verwendet. 5 ccm davon werden mit der fast neutralen Arbacieneierfarbstofflösung versetzt, bis das Gemisch tiefrot gefärbt ist. Nun wird ges. Ammonsulfatlösung vorsichtig zugesetzt, bis kein Glykosid mehr in Lösung ist. Die jetzt vorgenommene Filtration ergibt ein farbloses Filtrat und einen tief gefärbten Filtrerrückstand.

13. Arbacieneierfarbstoff und Helleborein. Der in analoger Weise angestellte Versuch ergibt ebenfalls ein farbloses Filtrat und einen tief gefärbten Filtrerrückstand.

Diese Versuche mit ganz beliebig herausgegriffenen Farbstoffen zeigen, dass die Saponinsubstanzen in hohem Masse die Fähigkeit besitzen, beim Ausfallen aus der mit Ammonsulfat versetzten wässerigen Lösung gewisse Farbstoffe, welche durch diese Menge Ammonsulfat an sich nicht gefällt werden, quantitativ mit niederzureissen. Das Mitniederreissen der Rinden- und Wurzelfarbstoffe wird dadurch leichter verständlich. Wie weit dies pflanzenphysiologisch von Bedeutung ist, vermag ich nicht zu sagen. Sämtliche Sapogenine wirkten auf die genannten Farbstoffe bei Zusatz von Ammonsulfat zu ihren Lösungen ebenfalls fällend. Blutfarbstoff (Oxyhämoglobin) wurde dagegen weder bei der Fällung der Saponine noch bei der der Sapogenine mit niedergerissen.

Bei einem Gespräche über derartige Fragen mit Dr. Al. Nathansohn, damals Assistent der zoologischen Station in Neapel, machte dieser mich darauf aufmerksam, dass die Saponine sogar ohne auszufallen die Fähigkeit haben, Farbstoffe — und vielleicht noch viele andere Substanzen — an sich zu reissen. Dies war der Anstoss zu den nachstehenden Dialyseversuchen. Ich muss zur Erklärung der Unvollständigkeit derselben im voraus bemerken, dass ich nach meiner Rückkehr von Neapel in Rostock eine mir gütigst zugesandte Arbeit von M. Heidenhain<sup>1)</sup> vorfand, welche in ungemein gründlicher Weise in Fortsetzung früherer Studien<sup>2) 3)</sup> die Beziehungen von Farbstoffen zu kolloiden

<sup>1)</sup> Neue Versuche über die chemischen Umsetzungen zwischen Eiweisskörpern und Anilinfarben, insbesondere unter Benützung der Analyse. Pflügers Arch. Bd. 96, 1903, p. 440.

<sup>2)</sup> Ueber chemische Umsetzungen zwischen Eiweisskörpern und Anilinfarben. Ebenda Bd. 90, 1902, p. 115.

<sup>3)</sup> Ueber chemische Anfärbung mikroskopischer Schnitte und fester Eiweisskörper. Zeitschr. für wissensch. Mikroskopie und mikroskop. Technik. Bd. 19, 1902, p. 431.

Substanzen untersucht. Ich möchte diesem Autor nicht in sein Arbeitsgebiet weiter eingreifen, habe daher meine Versuche abgebrochen und will mich begnügen, einige von mir noch ohne Kenntnis der Heidenhainschen Ergebnisse in Neapel gemachte Experimente mitzuteilen.

Sämtliche Versuche wurden in der Weise angestellt, dass in einen Ellwanger Dialysierschlauch, der auf seine Integrität vorher geprüft worden war, die nicht zu verdünnte Saponinlösung, welche möglichst farblos sein muss, gebracht wurde. Dann wurde dieser in ein grösseres Gefäss gehängt, welches bis zu derselben Höhe, in welcher innen im Schlauch die Saponinlösung stand, blau oder rot gefärbtes destilliertes Wasser enthielt. Die Färbung wurde durch 1—2 Tropfen 1% iger Methylenblau- oder Neutralrotlösung hervorgebracht. Das System blieb 16—24 Stunden sich selbst überlassen. Dann wurde der Inhalt des Schlauches entleert und die Intensität der etwa eingetretenen Färbung seines Inhaltes mit der Intensität der Färbung des Aussenwassers verglichen.

Um die eintretende Aenderung der Farbstoffverteilung richtig beurteilen zu können, nahm ich vorher nochmals eine Prüfung der Dialysierfähigkeit einiger Saponinsubstanzen unter Anwendung von Ellwanger Schläuchen und 12—16stündiger Dauer der Versuche vor und fand von neuem, was ich schon oben (S. 2) gesagt habe, dass unsere Stoffe selbst in der Hitze nur sehr langsam und mangelhaft dialysieren. Da also nur sehr wenig vom saponinhaltigen Schlauchinhalt nach aussen geht, war zu erwarten, dass auch von aussen ausser Wasser nur sehr wenig in den Schlauch eintreten werde. Wie weit diese Vermutung richtig oder unrichtig ist, sollen die nachstehenden Versuche zeigen. Das Volumen der innern Flüssigkeit nahm bei allen Versuchen etwas zu, das der äussern ab.

1. Methylenblau und Melanthin. Innen im Schlauch 30 ccm 3% ige neutralisierte Lösung von Melanthin. Dieselbe ist ganz farblos. Aussen um den Schlauch herum genau bis zur Höhe der innern Flüssigkeitssäule destilliertes, durch einige Tropfen 1% iger Methylenblaulösung deutlich blau gefärbtes Wasser. Die absolute Menge der äussern Flüssigkeit ist bei diesem Versuch wie bei allen folgenden etwa 4—5mal so gross als die innere. Nach 16 Stunden werden beide Flüssigkeiten auf ihre Farbe geprüft. Dabei ergibt sich, dass die Intensität

der Blaufärbung aussen abgenommen hat. Die innere Flüssigkeit, d. h. also die Melanthinlösung, ist blau geworden, aber nicht nur ebenso blau wie die äussere Flüssigkeit, sondern mindestens doppelt so blau. Von Flocken- oder Niederschlagbildung ist nichts wahrnehmbar. Die chemische Untersuchung der äusseren Flüssigkeit ergibt, dass nur Spuren von Melanthin in dieselbe übergegangen sind. Innen dagegen lässt sich noch fast ebensoviel Melanthin nachweisen als vorher vorhanden war.

2. Methylenblau und Chamälinin. Innen 20%ige farblose Lösung von Chamälinin; aussen bis zur gleichen Höhe Methylenblauwasser von derselben Farbenintensität wie beim vorigen Versuche. Nach 24stündigem ruhigem Stehen hat sich die äussere Flüssigkeit fast völlig entfärbt, während der Schlauchinhalt tief dunkelblau geworden ist. Dabei ist er aber durchaus frei von Trübung oder Niederschlag. Die Intensität der Färbung ist innen mindestens 10mal stärker als aussen.

3. Methylenblau und Saponinum purissimum Merck (Sapotoxin). Innen die 20%ige Saponinlösung; aussen Methylenblauwasser. Nach 17 Stunden aussen fast keine Färbung mehr wahrnehmbar, während die Saponinlösung innen dunkelblau geworden ist. Ausfällung irgend welcher Art ist aber nicht eingetreten.

4. Methylenblau und Cyclamin. Innen 50 ccm heissgesättigter farbloser, wässriger Cyclaminlösung; aussen Methylenblauwasser. Nach 20 Stunden aussen fast völlige Entfärbung, innen dagegen Dunkelblaufärbung.

5. Methylenblau und Smilacinum cristallisatum. Innen 70 ccm durch Kochen gelöstes 2%iges Smilacin (übersättigte Lösung); aussen 110 ccm Methylenblauwasser. Nach 22 Stunden innen die (durch Ausfallen getrübe) Lösung tiefblau; aussen Bläuung nur noch sehr gering.

6. Neutralrot und Sapotoxin. Innen 35 ccm 10%iger farbloser Sapotoxinlösung; aussen 160 ccm intensiv rot gefärbtes destilliertes Wasser. Nach 16 Stunden aussen die Rotfärbung der Flüssigkeit recht schwach, innen mindestens doppelt so stark. Ferner ist ein Teil des Farbstoffes dadurch verloren gegangen, dass sich die Schlauchwandung durch Adsorption intensiv rot gefärbt hat.

7. Arbacieneierfarbstoff und Saponinum purissimum Merck. Innen 25%ige Saponinlösung und aussen destil-

liertes Wasser, welches mit der S. 33 erwähnten, schwach sauren Farbstofflösung aus Arbacieneiern rot gefärbt ist. Nach 17 Stunden hat sich das Volumen der Saponinlösung beinahe verdoppelt, und dabei ist eine Rotfärbung eingetreten, welche fast 3mal intensiver ist als aussen.

8. Cyanin und Saponinum purissimum Merck. Die Saponinlösung innen ist 20%ig. Nach 17 Stunden ist die an Volumen stark vermehrte Saponinlösung doppelt so blau als das äussere Wasser.

9. Methylenblau und Helleborein. Innen 2 g Helleborein in 6 ccm Wasser gelöst; aussen 80 ccm Methylenblauwasser. Nach 22 Stunden innen 30 ccm intensiv grünblaue Flüssigkeit; äusseres Wasser fast farblos.

10. Methylenblau und Kondurangin. Innen 2 g Kondurangin in 10 ccm Wasser gelöst; aussen 50 ccm Methylenblauwasser. Nach 18 Stunden innen 20 ccm intensiv grünblaue Flüssigkeit; aussen fast völlige Entfärbung.

Diese Versuche zeigen, dass die Saponinsubstanzen die physikalisch kaum verständliche Eigenschaft haben, Farbstoffe in gelöster Form anzuziehen und aufzuspeichern. Es versteht sich wohl von selbst, dass pflanzenphysiologisch es von grösster Bedeutung sein muss, festzustellen, ob etwa auch andere gelöste Stoffe von den Saponinen angezogen werden. Auf das Verhalten zu Cholesterin und Lecithin komme ich weiter unten zu sprechen. Ich würde gern noch mit andern Farbstoffen und andern Saponinsubstanzen Versuche anführen, da ich solche gemacht habe. Ich lasse aber, um ganz sicher zu gehen, diese alle lieber weg, weil teils die Adsorption zu stark war (so z. B. bei Kongorot und Methylviolett) und teils die Lösungen der Saponine nicht ganz farblos waren (so bei Quillajasäure und Polygalasäure). Als Beleg dafür, dass bei Nichtsaponinen und auch beim Solanin der Verlauf der Versuche meist ein anderer ist, seien noch folgende Protokolle angeführt:

11. Methylenblau und Solaninum hydrochloricum. Innen 16 ccm unter Kochen hergestellte 10%ige Solaninlösung; aussen 44 ccm Methylenblauwasser. Nach 22 Stunden innen die Flüssigkeit viel weniger blau als aussen.

12. Methylenblau und Phloridzin. Das Phloridzin wird in der Hitze 2,5%ig gelöst und mit Ammoniak schwach

alkalisch gemacht. Nach 22 Stunden haben sich innen Kristalle von Phloridzin ausgeschieden; die Färbung des Schlauchinhaltes ist nur spurweis blau, während aussen die Flüssigkeit noch intensiv blau ist.

13. Methylenblau und Koniferin. Das Glykosid wird in kochendem Wasser 10%ig gelöst. Nach 21 Stunden finden sich im Schlauch reichliche Kristalle von ausgeschiedenem Koniferin, suspendiert in einer kaum merkbar blau gefärbten Flüssigkeit, während das Wasser aussen noch tief dunkelblau ist.

14. Methylenblau und Morphinum. Innen 45 ccm 4%ige Lösung von Morphinum hydrochloricum, aussen dunkelblaués Wasser. Nach 24 Stunden ist die Färbung des Wassers aussen noch mindestens doppelt so blau als die der Morphinelösung innen.

15. Methylenblau und Chinin. Innen 50 ccm gesättigte Lösung von Chininum hydrochloricum und aussen intensiv blau gefärbtes Wasser. Nach 20 Stunden ist die Färbung innen und aussen dieselbe.

Damit ist dargetan, dass die Fähigkeit, Farbstoffe anzuziehen und in Lösung aufzuspeichern, ausser dem Kondurangin eben nur den Saponinsubstanzen zukommt. Es unterliegt wohl keinem Zweifel, dass von den Saponinen auch noch andere Stoffe in gleicher Weise wie die Farbstoffe durch permeable Membranen angezogen und festgehalten werden. Für die Pflanzenphysiologie hat dies gewiss grosse Bedeutung.

#### IV. Ueber Saponinspaltung durch Enzyme.

Wie ich<sup>1)</sup> vor kurzem mit meinem Schüler W. Fischer gezeigt habe, gibt es bei niederen Tieren glykosidspaltende Enzyme. Es musste von Interesse sein, festzustellen, ob auch Saponinspaltungen dadurch ausgeführt werden können. Zu diesen Spaltungsversuchen wurde teils Saponin Trommsdorff, teils selbst dargestelltes Quillajasapotoxin verwendet. Das Trommsdorffsche Saponin erwies sich als ebenfalls aus Sapotoxin bestehend. Es

<sup>1)</sup> Pflügers Archiv, Bd. 99, 1903, p. 116.