

tropolones are described in the literature; specifically, 3-ethyltropolone has been characterized as a greenish-yellow copper complex, m.p. 219°^{8,9} and 223°¹⁰, while 4-ethyltropolone is a solid, m.p. 42°, copper complex, m.p. 156°¹¹, and 5-ethyltropolone is known in the form of colorless prisms, m.p. 81–82°, green copper complex, m.p. 274°^{8,9}. An IR-spectrum comparison between the natural product and synthetic 5-ethyltropolone, recovered from a copper complex salt, fully confirmed their mutual identity¹².

Attention is called to the fact point 5-ethyltropolone (or γ -northujaplicin) represents the second example of an uncommon class of nortropolones that may be widely distributed in Nature. The first compound in this series is 4-acetyltropolone, which was isolated recently from

Thujopsis dolabrata Sieb. et Zucc.^{13,14}. In recognition of this fact, a search was made for this particular material in the tropolone fraction of *Libocedrus formosana*, but it was not detected by various thin-layer chromatographic procedures¹⁵. Careful scrutiny of the heartwood extracts of the family Cupressaceae may reveal additional nortropolones, related in particular to the various α -, β -, and γ -thujaplicins.

Zusammenfassung. Es wird die Isolierung eines neuen Nortropolon-Derivates beschrieben.

Y.-T. LIN, K.-T. LIN, K.-T. WANG,
and B. WEINSTEIN

Department of Chemistry, National Taiwan University, Taipei (Taiwan, Republic of China), and Department of Chemistry, Stanford University, Stanford (California USA), October 15, 1965.

⁸ K. TAKASE, T. SUDO, and K. UNNO, reported at the 13th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan, Tokyo, April 1960.

⁹ T. NOZOE, *Non-Benzenoid Aromatic Compounds*, vol. 13; Ed. M. KOTAKE, *Organic Chemistry* (Asakura Book Store, Tokyo 1960), p. 158.

¹⁰ Shell International Research Maatschappij N.V., French Patent 1,338,875 (October 4, 1963).

¹¹ T. NOZOE, T. MUKAI, and S. MATSUMOTO, *Proc. Japan Acad.* 27, 110 (1951).

¹² We wish to express our thanks to Dr. T. ASAO, Department of Chemistry, Tohoku University, Sendai, Japan, for this collation of samples.

¹³ K. ITÔ, reported at the 12th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan, Kyoto, April 1959.

¹⁴ T. NOZOE, *Non-Benzenoid Aromatic Compounds*, vol. 13; Ed. M. KOTAKE, *Organic Chemistry* (Asakura Book Store, Tokyo 1960), p. 23.

¹⁵ Y.-T. LIN and K.-T. LIU, *J. Chinese chem. Soc., Taiwan* 10, 160 (1963) (footnote).

Zum Vorkommen von Maltose in vegetativen Pflanzenteilen

Einige der meist älteren Angaben über die Speicherung von Maltose in höheren Pflanzen wurden papierchromatographisch überprüft. Nachdem BAILEY¹ in *Trifolium*-Blättern eine intermediäre Anhäufung von Maltose bei einsetzendem Abbau der Assimilationsstärke nachgewiesen hat, sollten dabei zugleich Hinweise auf das Speicherverhalten dieses Zuckers gewonnen werden.

Die papierchromatographische Trennung der Zucker erfolgte nach der Extraktion² in Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5, V). Daneben fanden Phenol-Wasser und Butanol-Eisessig-Wasser als Laufmittel Verwendung. Allerdings liegen bei Anwendung von Phenol die R_f-Werte häufig ungünstig; bei Anwendung essigsäurehaltiger Gemische besteht stets Hydrolysegefahr. – Der Nachweis der Maltose erfolgte mit dem spezifischen Diphenylamin-Anilin-Reagenz^{3–5}, das eine charakteristische Farbreaktion ergibt und im Gegensatz zu Anilinhthalat auch ziemlich empfindlich ist. Die Mengen wurden durch Schätzung der Fleckintensitäten gegen chromatographisch gleich behandelte bekannte Maltosemengen ermittelt.

In einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt: Das von GILLOT⁶ festgestellte Vorkommen von Maltose in Rhizomen von *Mercurialis perennis*, das BRIDEL⁷ als nicht gesichert ansah, konnte bestätigt werden. Im Spätherbst finden sich deutlich grössere Mengen als im Frühjahr (Anfang November: um 1,5%; Ende April: 0,2 bis 0,5% i.T.), wenn auch der Maltosegehalt bei den von uns untersuchten Pflanzen stets geringer war als von GILLOT angegeben. Man wird mit diesem Autor annehmen können, dass die Maltose hier als echter Speicherzucker

fungiert. Ähnliches dürfte auch für die Knollen von *Umbilicus pendulinus* gelten. In diesen fand BRIDEL⁷ im Herbst grosse Mengen an Maltose; im April war sie nur in Spuren (um 0,1%) nachweisbar⁸.

Im Rhizom von *Aconitum napellus* konnte entsprechend den Angaben von LASCOMBES und CARLES⁹ Maltose gefunden werden, wenn auch in unseren Versuchspflanzen die Menge im Dezember geringer war. Auch *Aconitum lycoctonum* enthält in den unterirdischen Teilen Maltose, aber wesentlich weniger als die Rhizome von *Aconitum napellus* zur gleichen Zeit. – Die Angabe von VAN DIE¹⁰ über Maltosevorkommen in Blättern von *Solanum lycopersicum* konnte bestätigt werden; im August betrug die Maltosemenge ca. 0,1–0,2% i.T.

In Übereinstimmung mit BACON¹¹ und im Gegensatz zu PANT et al.¹² war Maltose in frisch geernteten Zwiebeln von *Allium cepa* nicht nachzuweisen. Zwar ist nach einjähriger Lagerung ebenso wie in austreibenden Zwiebeln das Auftreten von Maltose nicht sicher auszuschliessen. Wenn hierbei jedoch Maltose überhaupt auftritt, so kann

¹ R. W. BAILEY, *Nature, Lond.* 199, 1291 (1963).

² K. JEREMIAS, *Planta, Berl.* 52, 195 (1958).

³ J. L. BUCHAN und R. J. SAVAGE, *Analyst* 77, 401 (1952).

⁴ S. SCHWIMMER und A. BEVENUE, *Science* 123, 543 (1956).

⁵ R. W. BAILEY und E. I. BOURNE, *J. Chromatogr.* 4, 206 (1960).

⁶ M. P. GILLOT, *J. Pharm. Chim., Sér. VII*, 28, 148 (1923).

⁷ M. BRIDEL, *C. r. Acad. Sci., Paris* 179, 1190 (1924).

⁸ U. KULL, *Beitr. Biol. Pflanzen* 41, 231 (1965).

⁹ S. LASCOMBES und J. CARLES, *C. r. Acad. Sci., Paris* 242, 664 (1956).

¹⁰ J. VAN DIE, *Acta bot. neerl.* 71, 418 (1962).

¹¹ J. S. D. BACON, *Biochem. J.* 67, 5P (1957).

¹² R. PANT, H. O. AGRAWAL und A. S. KAPUR, *Flora* 152, 530 (1962).

es sich nur um sehr geringe Mengen ($< 0,05\%$ i.T.) handeln. – Auch in *Equisetum arvense* fanden wir eine geringe Maltosemenge, die hier ebenfalls keine Bedeutung als Speicherkohlenhydrat haben dürfte.

Durch autoradiographische Untersuchungen konnte KANDLER¹³ zeigen, dass Maltose in höheren Pflanzen weit verbreitet ist. Dabei handelt es sich aber häufig um Mengen, die papierchromatographisch nicht fassbar sind und damit speicherungsphysiologisch keine Rolle spielen, wie auch neue Untersuchungen von KANDLER¹⁴ gezeigt haben¹⁵.

Summary. Some older results on the occurrence of maltose in higher plants have been verified; semiquanti-

tative estimations were made. Also maltose is detected in *Aconitum lycoctonum* and in *Equisetum arvense*.

K. JEREMIAS und U. KULL

Botanisches Institut der Technischen Hochschule
Stuttgart (Deutschland), 15. Oktober 1965.

¹³ O. KANDLER, Ber. dtsch. bot. Ges. 77, 62 (1964).

¹⁴ O. KANDLER, Vortrag Botanikertagung Bonn (1965).

¹⁵ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Sachbeihilfen.

The Demonstration of Lysosomes in the Bovine Adrenal Medulla

Recent work has demonstrated the presence of six acid hydrolases in homogenates of bovine adrenal medulla¹⁻³. By the use of centrifugation on a sucrose density gradient it was found that these enzymes were concentrated in a fraction distinct from both the chromaffin granules and the mitochondria. The enzymes studied (acid phosphatase, acid DNase, acid RNase, β -glucuronidase, cathepsin and arylsulphatase) are characteristic of cell organelles defined as lysosomes by DE DUVE^{4,5}. Several studies of the acid phosphatase content of adrenal medullary cells have been reported^{6,7}, but no definite intracellular localization of this enzyme has been described; COUPLAND⁷ suggested that it may be associated with the occurrence of lysosomes.

Although the results quoted suggested very strongly that lysosomes were present in chromaffin tissue^{2,3}, it seemed desirable to confirm this by applying histochemical and electron-microscopic techniques to tissue sections, using acid phosphatase as a marker enzyme. Such methods would make it possible to determine the precise morphological location of the enzyme.

Methods. Small pieces of bovine adrenal medulla, obtained from the slaughterhouse, were fixed without delay for 3 h at 4°C in a 3% solution of glutaraldehyde buffered with cacodylate to pH 7.4. The fixative was washed out with the same buffer overnight (4°C) and frozen sections were prepared for histochemistry: sections were 10 μ thick for optical microscopy and 30 μ thick for subsequent electron microscopy. The sections were incubated at 37°C for 15, 30 and 60 min in a fresh β -glycerophosphate medium (pH 5.0) prepared as described by GOMORI⁸. After incubation the sections were washed for 1 min in 1% acetic acid, in order to remove any non-specific adsorption of lead ions.

Sections intended for optical microscopy were treated with a dilute solution of yellow ammonium sulphide to demonstrate the reaction product; sections to be used for electron microscopy were treated for 1 h in a 1% solution of osmium tetroxide at room temperature before dehydrating in a graded series of alcohols, embedding in Araldite and preparing 800 Å thick sections for examination. Some of these sections were examined without fur-

ther treatment, but others were stained with Reynolds' lead citrate for 8 min in order to increase their contrast. Control incubations were carried out in the absence of substrate and also in the Gomori medium plus 0.01 M sodium fluoride.

Results. With the light microscope acid phosphatase was found to be present in the bovine adrenal medulla, but rather long incubation periods were required. After incubation for 30 min the reaction product was localized to a few granules scattered throughout the cytoplasm of the chromaffin cells (Figure 1). After 60 min there was only a slight increase in the intensity of the reaction. There was no reaction in either type of control. These results confirm those of COUPLAND⁷.

Electron-dense bodies, about 0.6 μ in diameter and bounded by a membrane, were seen on electron-microscopic examination of fresh tissue that had been fixed immediately in glutaraldehyde followed by osmium. These dense bodies were much less frequent than chromaffin granules, only one or two being seen in any section of a cell (Figure 2). These organelles had a variable electron density; such a polymorphic appearance is consistent with the morphological concept of the lysosome⁵.

Electron microscopy was also used for sections that had been incubated in the Gomori medium, since it has been shown that the acid phosphatase test is specific and capable of application at the level of resolution afforded by the electron microscope^{9,10}. When this procedure was

¹ H. BLASCHKO, A. D. SMITH, and H. WINKLER, Biochem. J., 96, 49P (1965).

² A. D. SMITH and H. WINKLER, J. Physiol., in press.

³ H. KOENIG, R. MYLROIE, D. GAINES, R. GRAY, and T. McDONALD, Neurology, 15 289 (1965).

⁴ C. DE DUVE and I. T. HAYASHI, Subcellular Particles (Ronald Press, New York 1959), p. 128.

⁵ C. DE DUVE, Lysosomes (Churchill, London 1963), p. 1.

⁶ O. ERÄNKÖ, Acta anat. 15, Suppl. 17 (1952).

⁷ R. E. COUPLAND, The Natural History of the Chromaffin Cell (Longmans, London 1965), p. 20.

⁸ G. GOMORI, Microscopic Histochemistry (University of Chicago Press, Chicago 1952), p. 189.

⁹ S. J. HOLT and R. M. HICKS, J. biophys. biochem. Cytol. 41, 47 (1961).

¹⁰ E. ESSNER and A. B. NOVIKOFF, J. biophys. biochem. Cytol. 9, 773 (1961).