

spermschnitte von *Strychnos nux vomica* (frisches Material aus dem botanischen Garten in Saigon) gaben mit Ammoniak Blaufärbung. Mehrere große Schnitte kamen in einen ausgehöhlten Objektträger in einen großen Tropfen Ammoniak, das Deckglas wurde luftdicht verschlossen. Zunächst entstanden die Alkaloidfällungen und nach 5 bis 8 Stunden ließ sich beim Halten der Objektträger über eine weiße Unterlage eine Blaufärbung feststellen. An Handelsmaterial gelang die Reaktion nicht und bei den geprüften 9 frischen Samen trat nur 4 mal eine kräftige Färbung ein. Für sich allein ist die Reaktion nicht beweisend, auch wenn sie, wie im vorliegenden Falle, mit Ammoniumkarbonat ebenfalls eintritt. Ob der Nachweis von Kupfer nach Bradley¹⁾ mittels Blauholzhamatoxylin (Blaufärbung), der noch bei 1:1000000000 gelingen soll, auch bei Geweben erbracht werden kann, muß erst erprobt werden, würde aber gleichfalls die nötige Kritik erfordern (Aluminium, S. 128). Besser wäre, weil kristallinische Produkte gebend, Caesiumchlorid²⁾. Dieses gibt mit Kupferverbindungen in salzsaurer Lösung gelbe oder rote, nadelförmige oder prismatische Kristalle. Die Reaktion gelingt noch mit 0,1 µg. (Weitere Reaktionen bei Behrens, Anleit. S. 75—78).

II. Organischer Teil.

1. Methanderivate.

Dulcit, Mannit, Sorbit.

Die sechswertigen Alkohole Mannit, Dulcit, Sorbit finden sich häufig in Pflanzen. Mannit läßt sich leicht aus der Handelsmanna herstellen. Er scheidet sich aus der mit siedendem Alkohol bereiteten Mannalösung beim Erkalten kristallinisch aus. Aus Alkohol fällt er in feinen seidenglänzenden Nadeln, aus Wasser in farblosen Prismen. Mannit löst sich leicht in heißem Wasser und Alkohol, schwer in kaltem Wasser; unter Deckglas kann er mit kaltem Alkohol umkristallisiert werden (Fig. 34). Fehlingsche Lösung wird bei kurzem Kochen nicht reduziert. Mannit kommt zu 30—60% in der Handelsmanna vor (hier ist die abnorme Menge eine Folge der Verwundung von *Fraxinus ornus*), ferner in *Laminaria flexicaulis*, *L. digitata*, *L. saccharina* (5—12%), in Pilzen (Mutterkorn,

¹⁾ H. C. Bradley, Eine empfindliche Kupferreaktion und eine mikrochemische Probe auf Zink, Amer. Journ. of Sci., Ref. Chem. Centralbl., 1906, II, S. 1873.

²⁾ P. A. Meerburg u. H. Filippo, Chem. Weekbl., 1905, II, S. 461, Südd. Ap. Ztg., 1905, XLV, S. 835.

Lactarius-, Agaricus-, Elaphomyces-Arten), im Spargel, im ausgeschwitzten Saft mancher Fichten, Linden und Obstbäume, in Blättern (*Syringa vulgaris*, *Ligustrum vulgare*, Jasmin-Arten, *Olea europaea*, *Linaria*, *Apium graveolens*), in Rinden (*Canella alba*, *Phillyrea latifolia*, *Fraxinus excelsior*, *Wahrburgia Stuhlmannia*, *Platanus orientalis*, *Genipa brasiliensis*, *Basanacantha spinosa*) in Wurzeln (*Scorzonera hispanica*, *Daucus carota*, *Triticum repens*, *Punica granatum*, *Apium graveolens*, *Aconitum napellus*, *Meum athamanticum*, *Polypodium vulgare*, *Glycyrrhiza glabra*), in Früchten (*Coffea arabica*, *Opuntia vulgaris*, *Prunus laurocerasus*, *Laurus persea*). Dulcit scheidet sich aus der wässerigen Lösung der Madagaskar-Manna in monoklinen prismatischen Kristallen ab, die in kaltem Wasser schwerer als Mannit löslich sind. Dulcit findet sich in *Melampyrum pratense*, *M. nemorosum*, *Scrophularia nodosa*, *Evonymus europaea*, *E. atropurpurea*, *E. japonica*, hauptsächlich in Scrophulariaceen und Celastraceen. Bei Scrophulariaceen hat Monteverde Vorkommen oder Fehlen von Mannit und Dulcit als Gruppen-

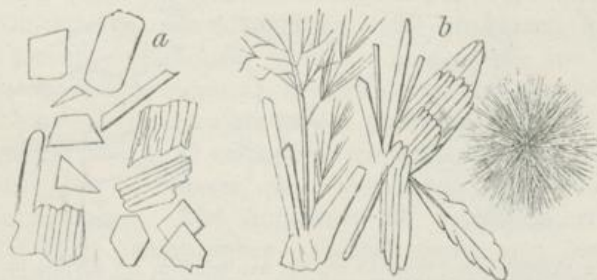


Fig. 34. a) Splitter reiner Manna (Droge, in Tränen), in Wasser liegend, beim Beginn der Lösung; b) Mannitkristalle mit Alkohol aus der Droge erhalten. Die gleichen Kristallformen erhält man bei der direkten Sublimation der Droge (Tunmann).

merkmal benutzt. Der isomere Sorbit ist nur in Früchten der Pomaceen und Prunaceen gefunden worden, wird aus den Früchten von *Sorbus aucuparia* dargestellt und bildet kleine farblose Kristalle, die sich leicht in Wasser, schwer in Alkohol lösen.

In physiologischer Hinsicht vertreten die Zuckeralkohole die Glykose. Stärkebildung aus Mannit und Dulcit hat 1885 A. Meyer und aus Sorbit in neuerer Zeit Treboux nachgewiesen. Der Mannit in den Früchten von *Olea europaea* soll nach Gerber und de Luca der Ölbildung dienen. Hartwich und Uhlmann konnten nur Spuren von Mannit nachweisen und geben Glykose als Ausgangsmaterial der Ölbildung bei *Olea* an.

Zum Nachweis der Zuckeralkohole ist es empfehlenswert, lebende Pflanzen benutzen zu können. Geeignete Objekte zum Nachweis von Mannit sind Blätter von *Olea europaea* und *Fraxinus ornus*, für den Nachweis von Dulcit junge Triebe von *Evonymus*-Arten. Sorbit läßt sich in den roten (nicht grünen) Früchten von *Sorbus aucuparia* nach-

weisen. Zum Nachweis von Dulcit brachte Borodin¹⁾ die Schnitte auf dem Objektträger in einen oder doch nur wenige Tropfen Alkohol, legte das Deckglas auf und ließ die Objekte langsam eintrocknen. Dulcit scheidet sich in Form von unregelmäßigen tafelförmigen oder prismatischen Kristallen aus. In gleicher Weise wies Monteverde²⁾ Mannit nach, der in feinen, glänzenden Nadeln auskristallisiert. Der Sorbitnachweis gelang mir derart nicht. Nun scheiden sich aus Alkohol nicht nur die Zuckeralkohole aus, sondern auch Kristalle von Salpeter, die mit Diphenylamin-Schwefelsäure leicht zu erkennen sind, ferner andere anorganische Salze, Asparagin (s. d.) u. a. Somit ist die Ausführung der Borodinschen Probe unbedingt erforderlich. Mannitkristalle wachsen und vermehren sich bei Zusatz einer völlig gesättigten, wässerigen Lösung von Mannit, während Dulcitkristalle langsam



Fig. 35. Mannitkristalle aus *Fraxinus ornus*, aus Schnitten mit Alkohol im Hängetropfen erhalten (Tunmann).

gelöst werden. Letztere wachsen andererseits bei Zusatz ihrer Lösungen, während die übrigen wasserlöslichen Ausscheidungen gelöst werden.

Sind nur geringe Mengen zugegen oder arbeitet man mit 1 bis 2 Schnitten, dann Sorge man für möglichst langsame Verdunstung, indem man mehr Alkohol anwendet, das Deckglas nach einiger Zeit abhebt und den Objektträger umlegt, so daß der Rest des Alkohols (als Hängetropfen) langsam verdunstet. Überwiegend entstehen die Kristalle erst nach 12–24 Stunden; sie finden sich fast stets am Deckglasrande zu baum- und strauchartigen Gruppen vereint (Fig. 35). Bessere Erfolge wie mit kaltem Alkohol habe ich bei verschiedenen Objekten erhalten (*Olea europaea*, *Fraxinus ornus*)³⁾, wenn die Schnitte

¹⁾ Borodin, Über die mikrochemische Nachweisung und die Verbreitung des Dulcits im Pflanzenreiche, Ref. Bot. Zentralbl., 1890, XLIII, S. 175.

²⁾ N. A. Monteverde, Über die Verbreitung des Mannits und Dulcits, Ann. agr., 1893, XIX, S. 444, Sep.

³⁾ Im Blatte von *Fraxinus ornus* war im Monat Juli stets mehr Mannit zugegen als im Blatte von *Olea europaea*.

in Alkohol aufgekocht wurden. Man kann auch einige Schnitte auf dem Objektträger in einigen Tropfen Wasser aufkochen, bis nur eine Spur Flüssigkeit zurückbleibt, dann das Deckglas auflegen und dem noch heißen Objekte Alkohol zufügen. Auch hierbei scheiden sich nach dem Verdunsten die Kristalle am Deckglasrande ab. Bei Behandlung mit heißem Alkohol ist nach dem Eindunsten die Kristallschicht am Deckglasrande oft makroskopisch sichtbar (Rindenparenchym von *Evonymus europaea*). Beim Versagen der Reaktion mit Schnitten muß ein größeres Pflanzenstück fein zerschnitten und im Reagenzglas mit Alkohol ausgekocht werden. Der alkoholische Auszug wird im Uhrglase eingedunstet und sein Rückstand untersucht.

Beim Mannitnachweis leistet die Sublimation brauchbare Dienste¹⁾. Bei der Handelsmanna erhält man ein Sublimat aus reinen Mannitkristallen (Fig. 34b). Bei pflanzlichen Objekten zieht man einige Schnitte auf dem Objektträger mit Alkohol aus, läßt den Auszug, nachdem die Schnitte beiseite geschoben wurden, eindunsten und sublimiert den Rückstand. Das Sublimat besteht dann fast ausschließlich aus Mannit. Der Sorbitnachweis ist am schwierigsten (Sorbit gibt kein brauchbares Sublimat). Er gelingt nur mit heißem Alkohol oder Wasser einigermaßen; es ist ratsam, den Objektträger eine Woche in den Exsikkator zu legen. Zum Aufsuchen der Sorbitausscheidungen ist polarisiertes Licht heranzuziehen. Vielfach findet man den Sorbit in sphärokristallinen Gebilden, die bei gekreuzten Nikols ein dunkles Kreuz zeigen und später moosartige Figuren bilden. Übrigens kristallisiert reiner Sorbit ebenfalls am Objektträger nur schwierig. Zuweilen (nicht immer) gelingt der Nachweis mit Benzaldehyd. Nicht zu dünne Schnitte von Sorbus (frische rote Früchte) werden mit verdünnter Schwefelsäure (1:10) befeuchtet und in Benzaldehyd eingelegt. — Der Nachweis der Zuckeralkohole in der Zelle gelingt nur selten.

Formaldehyd.

Nach der Hypothese von Bayer sollen die Pflanzen bei der Assimilation die Kohlensäure mit Hilfe des Chlorophylls zu Formaldehyd reduzieren; dieser wird dann weiter zu Kohlehydraten kondensiert. Der Nachweis von Formaldehyd ist daher von großer Bedeutung. Reinke und Braumüller beschäftigten sich mit dieser Frage schon 1899, dann nahm Curtius das Studium auf und hat in letzter Zeit mit Franzen²⁾ aus Blättern einen α , β -Hexylenaldehyd und vor

¹⁾ O. Tunmann, Zur Mikrochemie und Mikrosublimation einiger Methanderivate, Apoth. Ztg., 1912, XXVII, S. 971.

²⁾ J. Reinke u. Braumüller, Unters. über den Einfluß des Lichtes auf den Gehalt grüner Blätter an Aldehyd, Ber. deutsch. bot. Ges., 1899, XVII, S. 7.

kurzem aus *Carpinus betulus* Formaldehyd gewonnen (1 kg = 0,8613 mg). Nach Nizza¹⁾ soll ferner freier Formaldehyd, der kein Produkt der Assimilation ist, im Holze vorkommen. M. Kleinstück hat ihn im Kambialsaft der Koniferen gefunden (Ber. deutsch. chem. Ges., 1912, XLV, S. 2902).

Eine empfindliche Reaktion verdanken wir Grafe²⁾; sie beruht auf Bildung grüner Kondensationsprodukte des Formaldehyds und Diphenylamins. Benutzt wird eine 1% Lösung von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure. Die Präparate der betreffenden Blätter kommen in das Reagens, der Objektträger wird mehrere Male durch eine Flamme gezogen, die entstehende Grünfärbung zeichnet sich durch Haltbarkeit aus (andere Aldehyde geben bald rot werdende Färbungen, Benzaldehyd, Vanillin, Propion- und Isobutylaldehyd). Kimpflin³⁾ benutzt eine konzentrierte Natriumbisulfitleösung, die mit Methyl-p-amino-m-Kresol im Überschuß versetzt ist. Das Reagens wird in ein langes Rohr gebracht, dessen Ende umgebogen und in eine feine kapillare Spitze ausgezogen ist. Die Spitze wird in das Gewebe eingeführt (*Agave mexicana*). Die Einwirkung währt im Sonnenlichte einige Stunden. Dann wird der imprägnierte Teil abgeschnitten und in absoluten Alkohol gelegt. Der rote Niederschlag in vielen Parenchymzellen zeigt Formaldehyd an.

Meist wurde der Nachweis von Formaldehyd auf makrochemischem Wege zu führen versucht. Pollacci⁴⁾ benutzte Codein und Schwefelsäure, Schryver⁵⁾ Phenylhydrazinchlorid, Kaliumchlorid und Salzsäure. Letzteres Reagens ist jedenfalls dem von Rimini⁶⁾ nachgebildet, das aus Phenylhydrazinchlorid, Eisenchlorid und Salzsäure besteht, aber nach Arnold und Mentzel⁷⁾ auch mit Azetaldehyd und nach Meth⁸⁾ mit Akrolein reagiert (Rotfärbung). Phenylhydrazinchlorid, Nitroprussidnatrium und Kalilauge ist ebenso empfindlich und gibt eine

Th. Curtius u. H. Franzen, Aldehyd aus grünen Pflanzenteilen, Sitzber. Heidelberger Ak., 1910, XIII und: Vorkommen von Formaldehyd in den Pflanzen, Ber. chem. Ges., 1912, XLV, S. 1715.

¹⁾ S. Nizza, Il problema dell'aldeide formioa nelle piante, Malp., 1906, XX, S. 395.

²⁾ V. Grafe, Über ein neues spezifisches Formaldehydreagens, Österr. botan. Ztschr., 1906, LVI, S. 289.

³⁾ P. Kimpflin, Über die Gegenwart von Methanal (Formaldehyd) in grünen Pflanzen, Compt. rend., 1907, CXLV, S. 148.

⁴⁾ G. Pollacci, Atti R. Ist. Bot. dell'Univ. di Pavia, 1899, VI, S. 45.

⁵⁾ S. B. Schryver, Chem. Ztg., 1910, XXXIV, S. 125.

⁶⁾ Rimini, Ann. d. Farmacol., 1898, S. 97.

⁷⁾ Arnold u. Mentzel, Ztschr. f. Nahr. u. Gen., 1902, V, S. 353.

⁸⁾ Meth, Chem. Ztg., 1906, XXX, S. 666.

blaue Farbenreaktion. Möglicherweise sind diese Reaktionen mikrochemisch verwertbar.

Ameisensäure.

Ameisensäure (Monocarbonsäure), zuerst von Aschoff in *Pinus abies* (Holz und Nadeln) aufgefunden, tritt in geringer Menge (frei oder gebunden) in sehr vielen Pflanzen auf, besonders in Früchten (*Cerantia siliqua*, *Juniperus communis*, *Tamarindus indica*, *Sapindus saponaria*), ferner in *Sempervivum tectorum*, auch in Kryptogamen (*Plasmodium*, *Secale cornutum*, *Vaucheria*) und ganz allgemein in Wurzelspitzen (Goebel, Czapek, Kunze). Nach den makrochemischen Befunden von Stoklasa und Ernest¹⁾ fehlt aber Ameisensäure im Wurzelsekret. Bergmann²⁾ destillierte getrocknete feinzerriebene Pflanzenteile mit etwas Weinsäure im strömenden Wasserdampf und weist Ameisensäure im Destillat makrochemisch nach.

Innerhalb der Zellen wurde Ameisensäure in Wurzeln nachgewiesen, indem Wurzelstücke in eine konzentrierte wässrige Sublimatlösung gebracht wurden, die mit Wasser auf das fünf- oder zehnfache verdünnt war. Dann wird im Wasserbade 1 bis 2 Stunden erhitzt, sowie in Wasser und nachher in salzsäurehaltigem Wasser abgespült und nun das Material auf einige Minuten in eine schwach erwärmte 1% Kalilauge getaucht. Ameisensäurehaltige Teile zeigen sich durch Schwärzung an. In den Präparaten findet man die Schwärzung im Protoplasma (nicht im Zellsaft und Zellkern). Metallinstrumente dürfen bei der Reaktion nicht benutzt werden. Calomelbildung wurde zum Nachweis der Ameisensäure im Wurzelsekret herangezogen. Die Objekte gelangen in Sublimatlösung und werden bis auf 80° erhitzt. Die Ameisensäure reduziert Quecksilberchlorid zu Quecksilberchlorür, welches sich in sehr kleinen, in Salzsäure unlöslichen Würfeln abscheidet (Czapek³⁾, Goebel⁴⁾). Die Reaktion kann allerdings auch bei Gegenwart anderer reduzierender Stoffe eintreten. Deshalb brachte Kunze⁵⁾ die Säure als Bleisalz nach Behrens (Mikrochem. Reaktionen, IV) zur Abscheidung. Die Kristalle des Bleiformiat sollen gut kristallographisch bestimmbar sein. Die angeführten Reaktionen müßten jedenfalls noch eingehender studiert werden, da

¹⁾ J. Stoklasa u. A. Ernest, Beiträge zur Lösung der Frage der chemischen Natur des Wurzelsekretes, Jahrb. f. wiss. Bot., 1909, XLVI, S. 55.

²⁾ E. Bergmann, Nachweis der Ameisensäure, Bot. Ztg., 1882, XL, S. 731.

³⁾ F. Czapek, Zur Lehre von den Wurzelabscheidungen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 321.

⁴⁾ K. v. Goebel, Pflanzenbiologische Schilderungen II, Marburg 1891, S. 211.

⁵⁾ G. Kunze, Über Säureabscheidung bei Wurzeln und Pilzhypen und ihre Bedeutung, Jahrb. f. wiss. Bot., 1906, XLI, S. 360.

die Gegenwart von Ameisensäure im Wurzelsekret bestritten worden ist (s. oben).

Zu versuchen wären bei pflanzlichen Objekten noch folgende Reaktionen: Eine Lösung von Ceronitrat, die bei Gegenwart von freier Ameisensäure einen Zusatz von Magnesiumazetat erhält. Beim Eindunsten entstehen große, meist nicht gut ausgebildete, aber recht charakteristische Pentagondodekaeder von Ceriumformiat. Außerdem empfiehlt Haushofer¹⁾ bei nicht zu verdünnten Lösungen Silbernitrat (Bildung von Silberformiat, flimmernde, an den Enden ausgefranzte Kristalllamellen). Die Formiate geben (ebenso wie die Azetate) mit Eisenchlorid eine intensiv rote Farbenreaktion.

Oxalsäure.

Die Oxalsäure (eine Dicarbonsäure) wurde 1776 von Scheele durch Oxydation von Zucker mit Salpetersäure dargestellt und bald darauf von ihm aus dem Rheumrhizom gewonnen. Sie bildet sich allenthalben im Stoffwechselprozeß aus Zerfalls- und Oxydationsprodukten, nach Euler bei der Veratmung von Kohlehydraten. In freiem Zustande tritt sie sehr selten auf und wurde nur in *Boletus sulfureus*, *B. ignarius* (Tripier), *Cicer arietinum* (Trichome der Kichererbse, Dulong) und *Juglans regia* (männliche Kätzchen, Rochleder) angegeben. In größerer Menge wirkt sie auf die Pflanzen giftig (Gramineen können größere Quantitäten ohne Schaden vertragen, Bruch, Hartleb).

Der Nachweis freier Oxalsäure kann auf mikrochemischem Wege allein kaum mit Sicherheit geführt werden, zumal es sich in allen Fällen nur um Spuren handeln wird. Überdies wird die freie Säure beim Absterben der Zellen und beim Konservieren der Pflanzen mit den stets anwesenden Alkalien sofort Salze bilden. Reine Oxalsäure ist leicht löslich in Wasser, verdünnten Säuren und Glyzerin, löst sich aber nur schwer in Äther. Sie bildet langgestreckte monokline Prismen und Kombinationen (Haushofer, Mikr. Reakt., S. 82, Fig. 62) und sublimiert bei sehr vorsichtigem Erhitzen leicht (Behrens) in weißen Nadeln. Es erscheint aber fraglich, ob die Sublimation bei Schnitten und Pflanzenpulvern praktisch brauchbare Erfolge liefern wird, da Wasser und andere Substanzen des Pflanzenmaterials, ebenso rasches Erhitzen, zur Zersetzung führen.

Fast stets tritt die Oxalsäure in Form von Salzen auf, und zwar in kristallinischer Form (Kalziumsalz, Magnesiumsalz) oder in Form von im Zellsaft gelöster Salze (Kaliumsalz).

Die Oxalatkristalle kommen in den meisten Familien vor (Ausnahmen nach Kohl: Moose, Cyperaceen, Najadaceen, Lemnaceen, Orobanchaceen, Rhinanthaceen,

¹⁾ K. Hauskofer, Mikr. Reaktionen, S. 68.

Lentibulariaceen), sowie in allen Teilen der Pflanzen. Sie werden als Exkrete betrachtet. Ein Wiederauflösen der Kristalle (von Wehmer 1889 bezweifelt) findet nur selten und bei bestimmten Verhältnissen statt¹⁾. Die Oxalate werden als Schutzaffen gegen Tiere betrachtet (infolge ihrer peripheren Lagerung und ihrer giftigen Wirkung, der Käfer *Gastroidea viridula* frisst mit Vorliebe oxalsäurehaltige Blätter, Verschaffelt, s. Senfölglykoside). Bei Raphiden ist die Schutzwirkung (Stahl), die allerdings von Lewin bezweifelt wird, eine mechanische. Dafür spricht auch der anatomische Befund (Haberlandt). Reichliches Vorkommen von Oxalaten ist auf das Aussehen von Pflanzen und Drogen zuweilen von Einfluß. Die Graufärbung (von Cort. Cascarillae rührt von Oxalaten her, ebenso die grane Zeichnung der Querschnitte mancher Drogen (Cort. Frangulae, Rhiz. Gelsemii) und das Glitzern im Lichte (Iris, Guajacum, China, Quillaja). Der Gesamtgehalt an Oxalsäure schwankt in weiten Grenzen; meist beträgt er nur wenige Prozente (*Oxalis acetosella* 1,1%), doch auch 7,3% (Rheum), 20,7% (Guajacum) und steigt bis zu 80% (Cacteen). In mehrjährigen Koniferennadeln ist der Gehalt höher als in einjährigen.

Ganz überwiegend erscheint die Oxalsäure im Gewebe als **Kalziumoxalat**. Die Kalziumoxalatkristalle (Kalkoxalate) sind entweder der Membran eingelagert (Solms-Laubach, Pfitzer), oder sie befinden sich, wie in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, im Zellinhalte. Letztere entstehen im Plasma, nach Wakker in den Vakuolen des Plasma, jedenfalls innerhalb des Plasmasclauches. Sie umgeben sich später mit einer Hüllhaut, wie die Drüsen Rosanoffs. Die Hülle kann durch Balken mit der Zellwand in Verbindung treten (*Kerria*, *Tilia*, *Ricinus*). Bei Studien über die Bildung der Haut (lebendes Material) muß die Lösung der Kristallsubstanz durch stark verdünnte Salzsäure sehr vorsichtig bewirkt werden, da sonst die noch jugendlichen Gebilde leicht fortgerissen werden. Bei den *Aurantiaceen* werden die monoklinen Kristalle von der Zellwand gewissermaßen eingefangen und einseitig umwachsen (Oxalattaschen Pfitzers). In anderen Fällen, vorzüglich bei Kristallkammerfasern und bei analogen Bildungen, wächst die Membran auf allen Seiten gleichmäßig bis an den im Zentrum der Zelle liegenden Kristall heran, so daß nach dem Lösen des oxalsäuren Kalkes das Lumen des Umriß des Kristalles zeigt. Die umhüllende Substanz pflegt zuweilen in bestimmten Lamellen zu verholzen und zu verkorken (Fig. 36). Bei den Raphidenbündeln soll jede einzelne Raphide mit einer Hüllhaut umgeben sein (Wittlin). Es ist bekannt, daß die Oxalatkristalle infolge ihrer Ausbildung und ihres

¹⁾ Eine Auflösung der Oxalate wurde beobachtet von G. Kraus und seinen Schülern (*Rosaceen*), Frank (*Orchis*), Tschirch (*Begonia*), Tunmann (*Grindelia*); bei der Gummibildung (*Amygdalaceen*, Mikosch, *Bromeliaceen*, Boresch) u. a.; eine Zusammenstellung derartiger Fälle bei: Br. Massopust, *Lotos*, 1906, Nr. 7 u. 8.

Auftretens ein sehr wichtiges anatomisches Hilfsmittel bilden. Doch selbst zur makrochemischen Differentialdiagnose ist der oxalsaure Kalk herangezogen worden¹⁾.

Kalziumoxalatkristalle finden sich als Einschlüsse der Aleuronkörner (s. d.) und der Ölplastiden (s. d.).

In der Zelle treten die Kristalle entweder hinter den übrigen Zellbestandteilen zurück oder sie bilden den hauptsächlichsten Zellbestandteil. In letzteren Fällen spricht man von Oxalatzellen oder Oxalatschläuchen²⁾.

Kalziumoxalat ist dimorph. Die in der Pflanze vorkommenden Kristalle gehören teils dem tetragonalen (quadratischen) System (mit 6 Mol. Kristallwasser), teils dem monosymmetrischen (monoklinen)

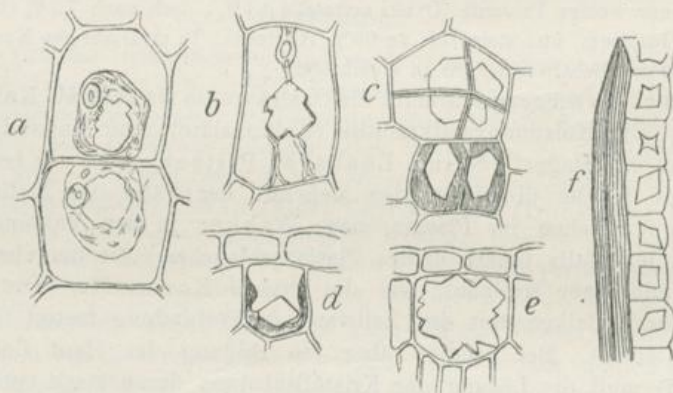


Fig. 36. Hüllen der Oxalatkristalle nach dem Lösen der Kristallsubstanz. *Ricinus communis*, a) jugendliche, b) ältere Markzelle, c) *Ononis spinosa* (Wurzel), d) *Citrus* (Blatt, Kristalltasche), e) *Juglans regia* (Blatt), f) *Rhamnus frangula* (Rinde) (Tunmann).

System an (mit 2 Mol. Kristallwasser). Im polarisierten Lichte leuchten tetragonale Kristalle schwach, monokline stark in bunten Farben. Die monoklinen Formen entstehen vielleicht aus freier Oxalsäure und einem unlöslichen Kalksalze³⁾.

¹⁾ J. Hendrick, Der Gehalt der Zimt- und Cassiarinde an Kalziumoxalat, Analyst, 1907, XXXII, S. 14. Cassia-Rinde hat nur bis 1,34% Oxalat, Zimtrinde stets mehr und bis 6%.

²⁾ Über die Verbreitung der Oxalatkristalle in den Pflanzen vergl.: F. G. Kohl, Anatomisch-physiologische Untersuchungen der Kalksalze und Kieselsäure in der Pflanze, Marburg 1889, H. Solereder, Anatomie der Dikotyledonen, Ergzbd., Stuttgart 1908, S. 347, und F. Netolitzky, Blattanatomie, 1905, 1908, 1911.

³⁾ C. Wehmer, Die Bildung freier Oxalsäure durch *Aspergillus niger*, Ber. deutsch. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 383.

Wir sehen von einer genauen kristallographischen Bestimmung der Oxalate ab und unterscheiden nachstehende Formen:

Einzelkristalle (Fig. 37) gehören verschiedenen Kristallsystemen an, treten häufig in Zwillingen auf. Für die großen Einzelkristalle im Mesophyll von *Agave mexicana* ist ein Gewicht von 0,00055 mg berechnet (Andrews). Sehr große Einzelkristalle findet man in Irisarten (Rhizom), sehr kleine, nur im polarisierten Lichte sicher zu erkennende, in vielen Drüsenzellen.

Drusen sind rundliche Kristallgruppen mit zentralem Stützpunkt, meist von morgensternförmiger Gestalt. An ihrem Aufbau beteiligen sich tetragonale und monokline Kristalle. Sehr große Drusen sind im Rhizom der Rheumarten und in den Blättern von *Juglans regia*, sehr kleine oft in den sezernierenden Zellen der Drüsen (*Grindelia*). „Drusenartige Gebilde“ fand F. Mayer¹⁾ im Mesophyll der *Pogostemoneen*; diese kommen dadurch zustande, daß zahlreiche Kristallnadelchen durch Fettmassen zusammengehalten werden und derart Drusen vor-
täuschen.



Fig. 37. Einzelkristalle von Kalziumoxalat. a) *Aretostaphylos uva ursi* (Blatt), b) *Krameria triandria* (Wurzel, stark vergrößert), c) *Jatropha palmata* (Wurzel) (Tunmann).

In den Drusen ist mehr oder weniger ein kleiner Einschuß im Zentrum sichtbar, den Sanio als proteinhaltig ansprach. Dieser Zentralkörper, der nach Buscalioni ein Schleimkörper, *corpo mucilaginoso*, sein soll, tritt bei Betrachtung der Objekte in Kanadabalsam deutlich hervor, wobei die Kristallmasse unsichtbar wird. Der Körper löst sich nicht in Äther, Alkohol, Chloroform, Schwefelsäure; er ist langsam in Chromsäure löslich, wird von Jodalkohol schwach gelb und auch von Osmiumsäure und Eisenchlorid gelblich gefärbt. Die Substanz ist färbbar mit Anilinblau, Alkannatinktur, Methylenblau, Säurefuchsin und bildet grüne Kupferverbindungen. Buscalioni²⁾ bringt 1 cm lange Stücke kalziumoxalatreicher Pflanzen auf einen Monat in eine konzen-

¹⁾ F. Mayer, System.-anatom. Unters. der *Pogostemoneae* Reichenb., Erlangen, Dissertation, 1909, S. 39.

²⁾ L. Buscalioni, *Studi sui cristalli di ossalato di calcio*, Malpighia 1895, IX, S. 469, 1896, X, S. 3.

trierte wässrige Lösung von Kupfersulfat oder Kupferazetat, stellt Mikrotomschnitte her, behandelt diese 1 bis 2 Tage im Thermostaten bei 38° mit 1—30% Essigsäure zur Lösung des Kupferniederschlags und färbt schließlich. Man wird den Schlußfolgerungen, daß es sich hierbei um einen schleimartigen Stoff (Pektin) handelt, nicht völlig beistimmen können. Es scheinen vielmehr verschiedene Stoffe am Aufbau des Zentralkörpers beteiligt zu sein und darunter vornehmlich Fette. Es gelang wiederholt den Kern in alkoholischem Chloralhydrat zu lösen und die Reaktionen von Buscalioni scheinen mir ebenfalls für die Gegenwart fettartiger Substanzen zu sprechen.

Raphiden sind nadelförmige Kristalle des monoklinen Systems. Sie sind meist gleichsinnig zu Bündeln vereint, die stets von einer Gummischleimhülle eingeschlossen sind (Fig. 26, S. 107). In der Epidermis sind Raphiden selten. Die Randzellen der kreiselförmigen Schuppenhaare am Pistill von *Cocos nucifera* sind mit je einem Raphidenbündel erfüllt¹⁾. Das Gewicht einer einzelnen Raphide von *Agave mexicana* berechnet Andrews zu 0,000 0038 mg (Lit. S. 18, 1).

Sphärite sind selten. Zuerst machte v. Höhnelt²⁾ auf sie aufmerksam bei *Terminalia*, dann Hegelmaier³⁾ bei den Samenschalen der Caryophyllaceen und Moebius⁴⁾ bei *Mamillaria*, *Cereus* und *Phyllocactus*, sowie bei *Broussonetia*, bei der sie im Endokarp auftreten, 18—25 μ lang werden und von der Wand einseitig umwachsen werden. Die Sphärite leuchten bei gekreuzten Nicols farbig auf, die der Cacteen zeigen ein orthogonales schwarzes Kreuz, nicht aber die von *Broussonetia*. Die Sphärite in *Phallus caninus* hält de Bary⁵⁾ für oxalsauren Kalk.

Von Wehmer⁶⁾ wurde wiederholt die Vermutung ausgesprochen, daß Raphiden und Sphärokristalle bei Phanerogamen aus Zitraten bestehen und nicht aus Kalkoxalat. Hierfür spricht einmal die Form. Es ist bisher noch nicht gelungen, Raphiden künstlich aus oxalsaurem Kalk herzustellen. Wehmer weist mit Recht darauf hin, daß Zitronensäure und ihre Salze den makrochemischen Befunden zufolge eine große Verbreitung besitzen, während die mikrochemischen Angaben hierüber recht spärlich sind. Es ist beachtenswert, daß man die kalkfreien Kristalle der Agaricinsäure (S. 152), die der Zitronensäure nahesteht, ebenfalls für Kalziumoxalate gedeutet hat.

¹⁾ M. Moebius, Über Raphiden in den Epidermiszellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 485.

²⁾ Fr. v. Höhnelt, Beitr. z. Anat. u. Phys., Bot. Ztg., 1882, XL, S. 177.

³⁾ F. Hegelmaier, Jahrb. f. wiss. Bot., 1874, IX, S. 286.

⁴⁾ M. Moebius, Sphärokrist. v. Kalkoxalat b. Cacteen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 178 u. Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXIV, S. 425.

⁵⁾ A. de Bary, Morph. u. Biol. d. Pilze, 2. Aufl., S. 12.

⁶⁾ C. Wehmer, Zur Charakteristik des zitronensauren Kalkes und einige Bemerkungen über die Stellung der Zitronensäure im Stoffwechsel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1892, XI, S. 333.

Kristallsand besteht aus sehr kleinen tetragonal-hemiedrischen Kriställchen, die zu vielen in einer Zelle auftreten. Die dicht gelagerten Kriställchen halten Luft zurück, so daß Kristallsandzellen in den Präparaten oft schwarz erscheinen.

In der mikrochemischen Feststellung von Oxalatkristallen wird un-
gemein leichtfertig vorgegangen. Gewöhnlich betrachtet man Kristalle,
die sich in Chloralpräparaten vorfinden, als genügend identifiziert, wenn
sie sich nicht in Essigsäure, wohl aber ohne Gasentwicklung in ver-
dünnter Salzsäure lösen und mit Schwefelsäure Nadeln geben. So sind
vielfach Irrtümer in der Literatur entstanden. Daß die sichere Dia-
gnose von Oxalatkristallen nicht immer leicht ist, erhellt am besten aus
der Tatsache, daß wiederholt Zellkerne mit Oxalat verwechselt wurden
(s. Zellkern) und daß andererseits andere Substanzen irrtümlich für
Oxalate angesprochen wurden. Derartige Unstimmigkeiten finden sich
sogar in wiederholt untersuchten Objekten. Um nur ein Beispiel an-
zuführen, kommen nach J. Moeller, A. Meyer und Tschirch in den
Crocusnarben Oxalate vor, während diese nach Molisch und nach der
eingehenden Studie von Müller¹⁾ bestimmt fehlen.

Zunächst ist zu beachten, daß in Chloralpräparaten, zumal in
älteren, eine gänzliche oder teilweise Lösung der Oxalate erfolgen
kann, falls das Chloralhydrat salzsäurehaltig ist (s. S. 33). Ebenso
werden Oxalate in Chlorzinkjodlösung, die oft Salzsäure enthält, meist
gelöst. Die Oxalate sind unlöslich in Wasser, auch beim Kochen und
in Essigsäure. Da der Essigsäure bei der Diagnose eine große Be-
deutung zukommt, so ist daran zu erinnern, daß Oxalate nicht nur mit
Zellulosehüllen, sondern zuweilen auch mit Schleimhüllen umgeben sind,
die das Eindringen der Essigsäure hindern können. Man muß unter
Umständen größere Quantitäten Essigsäure anwenden und längere Zeit
einwirken lassen. Ferner ist Kalkzitrat ziemlich schwer in Essigsäure
löslich und traubensaurer Kalk ist in Wasser und in Essigsäure un-
löslich. Letzterer löst sich aber in Kalilauge und bleibt darin gelöst,
während der oxalsaurer Kalk in das Kalium-Kalk-Doppelsalz übergeht.

Weitere Identitätsreaktionen geben die Mineralsäuren. Oxalate
lösen sich in verdünnter Salpeter-, Salz- und Schwefelsäure. Bei der
Lösung in Salzsäure dürfen Gasblasen nicht auftreten (Unterscheidung
von Karbonaten, s. S. 99). Mit Schwefelsäure müssen sich Gipskristalle
bilden, die ebenfalls mikrochemisch zu identifizieren sind (s. S. 117).
Zur Unterscheidung von nativ vorkommenden Gipskristallen dient
Chlorbaryumlösung. Gipskristalle überziehen sich in dieser mit einer
Kruste von Baryumsulfat (Kohl), während Oxalate unverändert bleiben.

¹⁾ R. Müller, Über die vermeintlichen Oxalatkristalle im Safran, Ztschr.
d. allg. österr. Apoth.-Ver., 1903, XLVII, Nr. 29, Sep.

Bei vorsichtigem Glühen geben die Oxalate kohlen-sauren Kalk, der in Säuren aufbraust, während bei starkem Glühen Ätzkali entsteht.

Wenn die angeführten Reaktionen sämtlich positiv ausfallen, dann kann mit einiger Sicherheit auf oxalsaurer Kalk geschlossen werden.

In den Membranen der Acetabularien kommt neben kohlen-saurem Kalk auch oxalsaurer Kalk vor, der nach Behandlung mit verdünnter Essigsäure in größeren Körnern („sphärolithische Bildungen“) zurückbleibt (Leitgeb¹⁾). In *Lupinus albus* (Samen) soll gelöstes Kalziumoxalat in loser Bindung mit freier Oxalsäure und mit Zitronensäure vorkommen (Belzung²⁾).

Magnesiumoxalat kommt nach Monteverde³⁾ in den getrockneten Blättern vieler Paniceen vor. Bei *Setaria viridis* findet es sich auch in den lebenden Zellen. Es bildet unregelmäßige Aggregate oder stark doppelbrechende, radial gestreifte Sphärite und tritt überwiegend in der Epidermis, seltener im Mesophyll auf. Die Kristalle lösen sich schwer in Wasser, sind unlöslich in Essigsäure, löslich in Salzsäure (ohne Gasentwicklung), in Schwefelsäure (ohne Bildung von Gipskristallen), in Salpetersäure; nach Behandlung mit Kalilauge verlieren sie Doppelbrechung und Streifung und werden löslich in Essigsäure, mit Gipslösung geben sie Kristalle von Kalziumoxalat und bei Einwirkung einer ammoniakalischen Lösung von Chlorammonium und Natriumphosphat entstehen die charakteristischen Kristalle von Ammoniummagnesiumphosphat. — In *Piper nigrum* (Perikarp) finden sich Kristalle von Magnesiumoxalat, die in Kalilauge braun, in Chloralhydrat farblos erscheinen (W. Plahl, Arch. f. Ch. u. Mikr., 1912, V, S. 320).

Zum Nachweis der im Zellsaft gelösten oxalsaurer Salze stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Überwiegend wird es sich um das saure Kaliumsalz handeln. Dieses läßt sich in Rumex-, Rheum- und Oxalis-Arten, vornehmlich in frischem Material aus dem Monat Mai ohne weiteres durch Eintrocknen der Präparate auf dem Objektträger zur Kristallisation bringen und nach Borodin prüfen (bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Lösung von saurem oxalsaurer Kali Zunahme der Ausscheidung). Nach Knoll⁴⁾ führen die ausge-

¹⁾ H. Leitgeb, Die Inkrustationen der Membran von Acetabularia, Sitzber. Wiener Akad., 1887, XCVI 1, S. 15.

²⁾ E. Belzung, Sur l'existence de l'oxalate de calcium à l'état dissous, Journ. de Bot., 1894, VIII, S. 213.

³⁾ N. A. Monteverde. Über die Ablagerung von Kalzium- und Magnesiumoxalat in der Pflanze, Bot. Centralbl., 1890, XLIII, S. 327.

⁴⁾ F. Knoll, Über die Abscheidung von Flüssigkeit an und in den Fruchtkörpern verschiedener Hymenomyceten, Ber. d. bot. Ges., 1912, XXX. Gen.-Vers. Heft, S. 43.

schiedenen Tropfen der Fruchtkörper von Agaricaceen ebenfalls ein Kaliumsalz der Oxalsäure. Bei *Atropa belladonna* scheint das Vorkommen des Kaliumsalzes sehr vom Boden abhängig zu sein, im Juni war es im Blatte nicht nachweisbar. Natronsalze treten in *Salsola* und *Salicornia* auf.

Schimper¹⁾ benutzte zum Nachweis Uranylazetat. Ist die Menge an gelösten Oxalaten in den Präparaten nicht zu gering, dann bilden sich rhombische Kristalle von Uranoxalat. Die größeren Kristalle erscheinen gelb und leuchten im polarisierten Lichte stark auf.

Man kann ferner die gelösten Oxalate in den Präparaten durch Zusatz von Kalziumnitratlösung in Kalziumoxalate überführen und diese dann in bekannter Weise mikrochemisch identifizieren. Auch Kalziumchloridlösung (1 + 3) läßt sich zur Erzielung von Kalziumoxalat verwenden. Doch durchdringt die Lösung schwer das Gewebe, auch erscheinen die Kristalle nicht in den Zellen, sondern meist auf den Präparaten. Um die Kalziumoxalate in den Zellen zu erhalten, legte Gießler²⁾ größere Pflanzenstücke in eine kochende, konzentrierte Kalziumchloridlösung. Steht eine Luftpumpe zur Verfügung, dann kann man mit Vorteil die Kalziumchloridlösung unter der Luftpumpe injizieren. Die auf diese Weise behandelten Pflanzenteile werden ausgewaschen und aus ihnen die Präparate hergestellt. Die Präparate zeigen nun die Oxalsäure als feinkörniges Kalziumoxalat, seltener kommt es zur Bildung von Sphäriten. Die Fällungen treten besonders deutlich bei Heranziehung von Vergleichspräparaten nicht behandelter Pflanzen hervor. Mit dieser Methode hat Gießler die größte Menge von gelösten Oxalaten in den peripheren Teilen der Organe nachgewiesen. Die unterirdischen Achsen enthielten nur wenig. Mikrochemische Reaktionen zur Identifizierung der Niederschläge (mit Essigsäure, Salzsäure, Schwefelsäure) sind hier ebenfalls erforderlich, denn auch Gerbstoffe werden als grauschwarze Massen niedergeschlagen und können Anlaß zur Verwechslung mit feinkörnigem Kalziumoxalate geben. Daher ist Aufhellen mit Chloralhydrat und polarisiertes Licht heranzuziehen. Zitronensaure Salze werden gleichfalls mitgefällt, das entstandene Kalkzitrat ist löslich in Essigsäure.

In Milchsäften scheinen gelöste Oxalate öfters vorzukommen (*Convolvulus tricolor*, Keimlinge, Czapek³⁾, *Apocynum cannabinum*,

¹⁾ A. F. W. Schimper, Z. Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 215.

²⁾ R. Gießler, Die Lokalisation der Oxalsäure in der Pflanze, Jenaer Ztschr. f. Naturwiss., 1893, N. F. XX, S. 344.

³⁾ Fr. Czapek, Zur Kenntnis des Milchsafsystems der Convolvulaceen, Sitzber. Wien. Akad., 1894, CIII, 1, Sep. S. 13.

Wurzel, Tunmann)¹⁾. Kocht man Präparate einige Minuten mit Wasser auf, dann scheiden sich kleine oktaederförmige Kristalle von Kalziumoxalat ab. Diese bilden sich nicht, wenn man den Milchsafte oder die Parenchymzellen für sich kocht. Mit Kalziumchlorid ist Oxalat im Milchsafte, mit Schwefelsäure Kalzium im Parenchym nachweisbar. Die Oxalsäure stammt somit aus dem Milchsafte, das Kalzium aus dem Parenchym.

Apfelsäure.

Apfelsäure (Monoxybernsteinsäure), 1785 von Scheele entdeckt, technisch aus unreifen Vogelbeeren (8%) gewonnen, gehört neben der Oxalsäure zu den verbreitetsten Pflanzensäuren. Sie tritt teils frei auf, teils an Kalium, Natrium, Kalzium, organische Basen gebunden. Ganz allgemein ist ihr Vorkommen in Früchten (Sorbus, Cydonia, Pirus malus); beim Reifen der Früchte schwindet sie. Durch hohen Gehalt zeichnen sich viele Succulenten (Crassulaceen) aus; besonders die Milchsäfte führen Apfelsäure (Euphorbium, Droge, führt 24% sauren, apfelsauren Kalk), ferner der Birkensaft, Polygonaceen (Rheum bis 3%), Solanaceen (Nicotiana, bis 3% saures apfelsaures Ammonium). Auch in Kryptogamen ist sie weit verbreitet, Polyporus-Arten, Psalliota, Equisetum, Angiopteris. Bei den Succulenten erfolgt in der Nacht vermehrte Bildung und Anhäufung von Apfelsäure. Warburg bringt diese Vorgänge mit der Chlorophylltätigkeit in Beziehung, Czapek²⁾ schreibt ihnen „die ökologische Bedeutung zu, den Gaswechsel bei Xerophyten möglichst sparsam und nutzbringend zu gestalten“. Nach Euler³⁾ entsteht sie bei der Veratmung von Kohlehydraten.

Der mikrochemische Nachweis der Apfelsäure ist schwierig. Über die Apfelsäure der Crassulaceen gibt Brenner⁴⁾ nur an, daß sich „in allen Zellen sehr leicht ein lösliches Kalksalz, offenbar saurer apfelsaurer Kalk, in großer Menge nachweisen läßt“ (Schwefelsäure, Oxalsäure), sowie daß beim Zusatz von Salpeterlösung „vor der eigentlichen Plasmolyse innerhalb der Vakuolenflüssigkeit die gelösten Salze zu einem stark lichtbrechenden Tropfen oder Klumpen“ ansammeln, der mit Schwefelsäure Gipskristalle liefert. Derartige Angaben sprechen nur für einen Kalkgehalt der betreffenden wasserlöslichen Verbindungen und können zu Irrtümern Anlaß geben, selbst dann, wenn makrochemisch für die zu untersuchenden Pflanzen die Anwesenheit von Apfelsäure erwiesen ist. Zunächst wird man darauf ausgehen, eine

¹⁾ O. Tunmann, Radix Apocyni cannabini, Pharm. Centralh., 1908, XLIX, S. 304.

²⁾ Fr. Czapek, Biochemie I, S. 428 und II, S. 428, dort die Literatur.

³⁾ H. Euler, Zur Kenntnis der Assimilationsvorgänge, Ztschr. f. phys. Chem., 1909, LIX, S. 122.

⁴⁾ W. Brenner, Untersuchungen an einigen Fettpflanzen, Basler Dissert., 1900, S. 9.

etwas größere Menge der apfelsauren Verbindungen zu gewinnen. Bei Pflanzen, in denen die Apfelsäure in reichlicher Menge auftritt, gelingt dies relativ leicht durch Austrocknen des ausgepreßten Zellsaftes oder durch Einlegen größerer Pflanzenstücke in 65–70% Alkohol. In letzterem Falle scheiden sich die Kristalle an der Oberfläche der Stücke oder auf den Schnittflächen und in der Nähe dieser in größerer Menge aus. Tangentialschnitte der eingelegten Stücke werden die meisten Kristalle führen. Die Ausscheidung erfolgt übrigens recht langsam.

In den Präparaten werden die Kristalle nach dem Borodinschen Verfahren geprüft, wobei zu erinnern ist, daß sowohl saure als neutrale Salze vorliegen können. Kristalle von neutralem apfelsauren Kalk

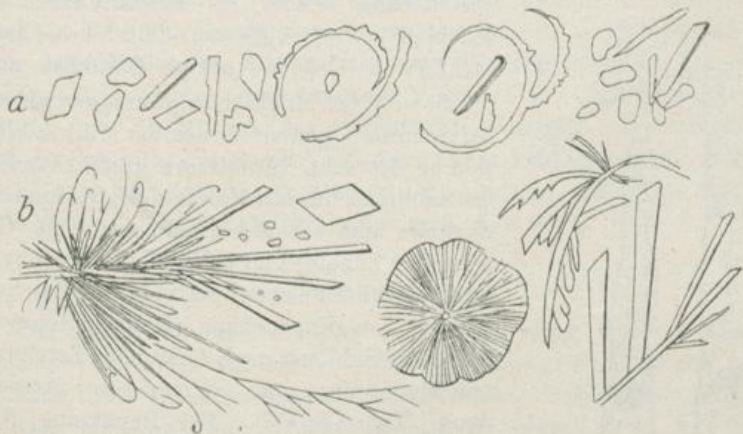


Fig. 38. Maleinsäure und Maleinsäureanhydrid im Sublimat a) von *Sorbus aucuparia* (Frucht) b) von *Euphorbium* (Droge) (Tunmann).

werden bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Lösung von neutralem apfelsauren Kalk wachsen und sich bei Zusatz einer wässerigen Lösung von saurem apfelsauren Kalk, weinsaurem Kalk und dergl. auflösen. Aus dem Rückstand des Zellsaftes oder dem in Alkohol eingelegten Material werden die Kristalle isoliert, evtl. durch Umkristallisieren gereinigt. Bringt man einige Kriställchen mit der Platinnadel in die Reduktionsflamme, dann wird Apfelsäure durch den charakteristischen Geruch an Bernsteinsäure angezeigt. Der gleiche Geruch würde bei Weinsäure auftreten, doch schwillt nach Belzung und Poirault¹⁾ weinsaure Kalk beim Erhitzen nicht an und gibt bei der Kristallisation aus Alkohol makroskopisch sichtbare Nadeln, während die Kristalle von apfelsaurem Kalk nur mikroskopisch zu erkennen sind.

¹⁾ E. Belzung et G. Poirault, Sur les sels de l'Angiopteris evecta et en particulier le malate neutre de calcium, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 286.

Die neutralen Alkalisalze kristallisieren selbst aus reinen Lösungen nur langsam aus, die sauren Salze kristallisieren leichter und sind luftbeständig. Meist wird es sich um das saure Kalziummalat handeln, das in kaltem Wasser schwer löslich ist (1:78) und zuweilen in, allerdings schlecht ausgebildeten, rhombischen Oktaedern in Glyzerinpräparaten erscheint. Das neutrale Kalksalz ist leichter in Wasser löslich und bildet feine Blättchen oder in lockeren Sphärokristallen angeordnete Nadeln. Apfelsaures Magnesium kristallisiert in rhombischen Säulen. Außerdem lassen sich apfelsaure Salze in neutraler Lösung mit Silbernitrat nachweisen. Es entstehen Sphärokristalle von Silbermalat, die sich in Ammoniak leicht auflösen und sich beim Eintrocknen der Lösung wieder als Kristallwarzen ausscheiden¹⁾. Freie Apfelsäure fällt hierbei hauptsächlich in 4- oder 8eckige Blättchen aus²⁾.

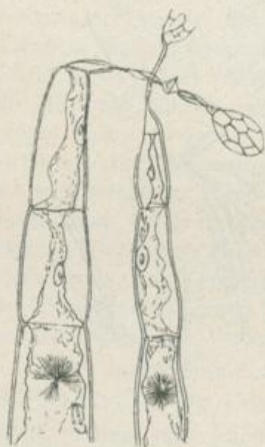


Fig. 39. Malatsphärite in *Nicotiana glauca* (Trichome), getrocknetes Material in Alkohol (Tunmann).

Sowohl bei Milchsäften, Auszügen als auch bei Schnitten kommt ferner die Mikrosublimation in Betracht. Apfelsäure gibt bekanntlich ein Sublimat, das aus Maleinsäure (prismatische Kristalle mit schiefen Endflächen, die Gipskristallen ähneln) und aus Maleinsäureanhydrid (rhombische Täfelchen) besteht. Bei der Sublimation von Euphorbium (Handelsdroge) gelangen im Sublimat nach 24 Stunden Zerrformen von Maleinsäure und -anhydrid zur Ausscheidung (Tunmann)³⁾. Bei Benutzung reichlicher Substanzmengen (0,01 g) sind die Kristalle makroskopisch sichtbar als filzartiger dichter Rasen, der wie eingetrocknetes Chloralhydrat aussieht. Die Maleinsäure gelangt dabei auch in Sphärokristallen zur Kristallisation (Fig. 38b). Bei den Crassulaceen muß man ein größeres Blattstück (1 qcm) zur Sublimation bringen, von dem man zuvor vorteilhaft die Kutikula, resp. die Epidermis, abgezogen hat. Die Kristalle bilden sich auch hier erst nach mehreren Stunden; es sind meist federförmige Kristallskelette, die zu „Sternen und Sonnen“ vereinigt sind. Auch Alkoholmaterial kann benutzt werden. Ein gutes Versuchsobjekt ist *Sorbus aucuparia* (Fig. 38a). Zur Sublimation ist eine höhere Tempe-

¹⁾ K. Haushofer, Mikr. Reakt., S. 67.

²⁾ F. Emich, Mikrochemie, S. 143.

³⁾ O. Tunmann, Vergl. Unters. über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 494.

ratur erforderlich. Die Spaltlinge der Apfelsäure gehen erst über, wenn der Schnitt im Verkohlen ist und schwarz wird!

Die in den getrockneten Tabakblättern beim Einlegen in Alkohol sich ausscheidenden Sphärite (Fig. 39), die in lebenden Blättern nicht zugegen sind, lassen sich durch Essigsäure sichtbar machen (Schimper)¹⁾, lösen sich langsam in Wasser und in Mineralsäuren, sind unlöslich in Alkohol, Äther, Glyzerin, blähen sich beim Verkohlen auf und sind jedenfalls ein apfelsaures Salz (Molisch, Histochemie, S. 38). In der Tat erhalten wir bei der Sublimation der mit Essigsäure aufgehellten und mit Alkohol ausgewaschenen Blätter typische Kristalle von Maleinsäureanhydrid (Tunmann, Apoth.-Ztg. 1912, S. 973). Auch die Kalziummalate des Birkensaftes (*Betula lenta*) sind in kaltem Alkohol schwer löslich²⁾. Diels³⁾, der die Zersetzung der Chloride in Halophyten verfolgte, fand in den von ihm untersuchten Pflanzen ebenfalls Apfelsäure und Dębski⁴⁾ deutet den braunen Niederschlag, den Bleiazetat in Blättern und Blattstielen der Marantaceen erzeugt, auf diese Säure. Über die Sphärite, die durch 70% Alkohol in kaktusähnlichen Euphorbien (Belzung) und in *Equisetum* (Tunmann) entstehen und die möglicherweise Kalziummalophosphat sind, s. S. 93 u. 94.

Fumarsäure.

Die Fumarsäure ist bis jetzt noch nicht näher studiert worden, doch ist es nach den bei der Apfelsäure gemachten Erfahrungen wahrscheinlich, daß sie sich ebenfalls durch direkte Sublimation aus den Schnitten heraussublimieren läßt, wenigstens überall dort, wo sie in größerer Menge auftritt. Kristalle von Fumarsäure wird man zuweilen in den ersten Sublimaten unreifer Sorbusfrüchte antreffen. Sie erscheinen als einzeln liegende kurze Prismen, die bei Wasserzusatz noch einige Minuten erhalten bleiben.

Weinsäure und Traubensäure.

Weinsäure (Weinsteinsäure, Dioxybernsteinsäure), in reinem Zustande von Scheele 1768 gewonnen, ist eine der weitverbreitetsten Pflanzensäuren, die sowohl frei als auch an Kalium oder Kalzium gebunden in den Pflanzen auftritt. Sie

¹⁾ A. F. W. Schimper, Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, 1888.

²⁾ W. Lenz, Über Birkensaft, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1909, XIX, S. 323.

³⁾ L. Diels, Stoffwechsel und Struktur der Halophyten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXII, S. 309.

⁴⁾ B. Dębski, Über den Bau und den Bewegungsmechanismus der Blätter der Marantaceen, Anzeiger d. Krakauer Akad., 1895. S. 244.

findet sich vorzugsweise in Früchten (*Tamarindus indica*, *Vitis vinifera*, *Sorbus aucuparia*), in Samen (*Myristica*), in Blättern (*Vitis vinifera*, *Chelidonium majus*, *Rumex acetosa*), aber auch in Wurzeln (*Evonymus europaea*, Runkelrüben, *Rubia tinctorum*, *Leontodon taraxacum*), Knollen (*Helianthus*) und selbst in niederen Pflanzen, so in Gefäßkryptogamen (*Lycopodium complanatum*), in Flechten (*Usnea barbata*, *Zeorina sordida*) und in Pilzen (*Cantharellus cibarius*).

Weinsäure bildet große monokline Prismen, die sich leicht in Wasser und in Alkohol, schwerer in Äther lösen. Saures Kaliumtartarat scheidet sich, meist gemengt mit Kalziumtartarat als Weinstein bei Wasserentzug (Alkoholmaterial, getrocknete Pflanzen) in undeutlich kristallinischen Schollen, Klumpen und Krusten ab, die unlöslich in Äther sind. Die Weinsteinklumpen in Drogen und Herbar-

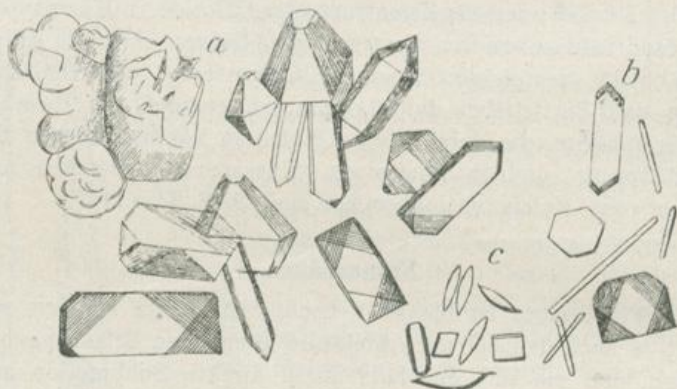


Fig. 40. a) Isolierter Weinsteinballen aus dem Fruchtfleisch der Korinthe (links oben), der mit Kalziumchlorid typische Kristalle von Kalziumtartarat bildet und b) mit verd. Kalilauge Kristalle des sauren Kalisalzes liefert; c) Kristalle von Traubensäure (Kaliumsals) (Tunmann).

material, die oft makroskopisch sichtbar sind und eine Freipräparation gestatten (Korinthen), sind nicht einheitlicher Natur, worauf die Beobachtung der Lösungsvorgänge im polarisierten Lichte hinweist. Es werden vielmehr schlecht ausgebildete Weinsteinkristalle durch Zucker, Pektine, Schleime u. a. untereinander verkittet (Fig. 40a). Auch neutrale und saure Kalziumtartarate (erstere in Blättern von *Vitis*, letztere in Früchten von *Rhus typhina*), die sich sehr wenig in Wasser, leicht in 10% Kali- und Natronlauge lösen, sowie Aluminiumtartarate (*Lycopodium clavatum*) treten auf. Die neutralen Kaliumtartarate lösen sich leicht in Wasser, die sauren Salze sind unter Deckglas nur bei größerem Wasserzusatz nach längerer Zeit in Lösung zu bringen. Kristallausscheidungen von neutralem Kalziumtartarat, die ebenfalls dem rhombischen System angehören, wurden von Schimper (l. c. S. 238)

in vergilbten Blättern und Blattstielen von *Vitis* und *Ampelopsis* aufgefunden und eingehend studiert. Sie lösen sich kaum im Wasser, sofort in 10% Kalilauge, sowie in 2–3% Essigsäure. In konzentrierter Essigsäure sind sie unlöslich. Hat man somit die Kristalle in verdünnter Essigsäure gelöst, dann erfolgt bei Zusatz von konzentrierter Säure wiederum ein Auskristallisieren von Kalziumtartarat. Beim Glühen gehen die Kristalle in schaumige Massen über, die sich in 10% Essigsäure leicht lösen.

Der mikroskopische Nachweis der Weinsäure wird vorteilhaft mit essigsaurem Kalium oder mit Chlorkalzium geführt (Schimper¹). Die Präparate dürfen zuvor nicht gewässert haben. Sie kommen auf dem Objektträger in einen kleinen Tropfen Wasser, werden durchmustert, um event. bereits vorhandene Ausscheidungen festzustellen; man läßt eintrocknen. Alsdann fügt man eine wässrige Lösung von essigsaurem Kalium (1:10) zu. Es bilden sich nach einigen Minuten rhombisch-hemiedrische Kristalle von saurem Kaliumtartarat, die in Essigsäure löslich sind. Ähnliche Kristalle erhält man zuweilen beim Aufhellen der Präparate mit Kalilauge. In vielen Fällen gelingt ferner die Reaktion mit wässriger Kalziumchloridlösung (1:10). Es bilden sich charakteristische Kristalle von Kalziumtartarat (Kombinationen von langgestrecktem Prisma und Doma u. a.), die sich leicht in verdünnter (2%), schwer in konzentrierter Essigsäure lösen. Zur Diagnose von saurem Kalziumtartarat ist diese Reaktion sehr geeignet; kocht man Weinsteinausscheidungen mit Kalziumchlorid unter Deckglas auf, dann gehen sie in die charakteristischen über 100 μ großen Kristalle von Kalziumtartarat über (Fig. 40a); auch wenn größere Mengen Kalziumtartarat im Weinstein zugegen sein sollten, so erscheinen diese erst nach der Reaktion in typischer Form.

Behandelt man Schnitte mit Weinsteinballen mit Kalilauge, so scheiden sich nach einigen Stunden Kristalle des sauren Kalisalzes in typischer Form aus, daneben aber auch kurze Nadeln (Fig. 40b). Ähnliche Kristalle erhält man beim Aufkochen der Schnitte in Wasser und nachfolgenden Zusatz von Alkohol.

Hat man etwas länger aufgekocht, bis etwa die Hälfte des Wassers unter dem Deckglase verdampfte, und der noch heißen Lösung Alkohol zugefügt, dann wird man nach 10 bis 12 Stunden und teilweiser Verdunstung regelmäßig kleine Kristalle von Traubensäure antreffen (Kaliumsalz) (Fig. 40c). Es sind teils flache Täfelchen, teils Kristalle von Wetzsteinform, die Diatomeen nicht unähnlich sind. Letztere

¹) A. F. W. Schimper, Zur Frage d. Assimilation der Mineralsalze d. d. grüne Pflanze, Flora 1890, LXXIII, S. 220.

Formen sind für die Traubensäure typisch. Aufkochen der Schnitte mit stark verd. Kalilauge liefert ebenfalls vereinzelte Kristalle von Traubensäure.

Als Hilfsreaktionen zum Nachweis der Weinsäure können dienen: Silbernitrat (kleine, wenig charakteristische Täfelchen, zuweilen knieförmig verwachsen), konz. Kaliumdichromat (gibt im Gegensatz zur Zitronensäure schwarze Färbung; in Früchten und Blättern, überhaupt im Gewebe des Gerbstoffes wegen nicht anwendbar), sowie Erhitzen mit Resorcinschwefelsäure (1:100, violettrote Färbung, die auch Polysaccharide geben).

Zitronensäure.

Zitronensäure, Oxytricarbaldehydsäure, im kristallinen Zustande zuerst von Scheele 1784 hergestellt, technisch aus Zitronen (7—9%) gewonnen, gehört zu den verbreitetsten Pflanzensäuren. Vorzugsweise findet sie sich in Früchten, teils für sich allein (Citrus, Vacciniumarten), teils neben Apfel- und Weinsäure (Tamarindus), teils neben Apfelsäure (Rubus idaeus, Ribes grossularia und nigrum). Auch in Samen (Lupinus), in Blättern (Convallaria, Erica, Nicotiana, Aconitum, Isatis u. a.), in Knollen (Dahlia, Helianthus) und Zwiebeln (Allium cepa) tritt sie vielfach auf. Gebunden kommt sie überwiegend als Kalksalz vor (Zwiebeln von Allium und Urginea); Magnesiumzitrat findet sich in Sorghum saccharatum. In Pilzen ist sie ebenfalls gefunden worden. Eine Anzahl Pilze (Citromyces, Penicillium luteum) bilden in Kultur auf kreidehaltiger Zuckerlösung Kalziumzitrat.

In der Literatur trifft man nur wenig Angaben über den Nachweis der Zitronensäure im Gewebe an, trotzdem sie so häufig vorkommt, weil der sichere Nachweis recht schwer ist und die makrochemisch benutzten Reaktionen mehr oder weniger versagen. Überwiegend werden die Zitrone in der Zelle in gelöster Form vorliegen.

Wehmer¹⁾ erhielt bei der Kultur von verschiedenen Pilzen in kreidehaltiger Zuckerlösung Kalziumzitrat, welches beim Erwärmen in Form von Sphäriten und Raphiden ausfiel. Die vielfachen Befunde über die Bildung von Kalziumzitratraphiden drängten Wehmer zur Überzeugung, daß die Raphiden höherer Pflanzen wahrscheinlich aus Kalziumzitrat und nicht aus Kalziumoxalat bestehen.

In Alkoholmaterial und in Schnitten, die längere Zeit in Glycerin oder in Wasser lagen, finden sich zuweilen (nicht immer) Abscheidungen von Kalkzitraten²⁾. Mit Kalziumchlorid lassen sich analoge Fällungen in Schnitten hervorrufen, aber nur bei Gegenwart größerer Mengen Zitronensäure. Es ist ratsam, die Schnitte zuvor mit etwas verd. Natronlauge zu versetzen. Die Fällung entsteht erst beim Kochen,

¹⁾ C. Wehmer, Charakteristik des zitronensauren Kalkes, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 333.

²⁾ E. Belzung, Journ. de Bot., 1891, V, S. 25.

ist aber wenig charakteristisch. Die für neutrales Kalkzitat charakteristische Wetzsteinform erhält man nur selten. Das Kalkzitat unterscheidet sich nun von den gleichzeitig mitgefällten Oxalaten durch seine Löslichkeit in Essigsäure, von den Kalksalzen anderer organischer Säuren durch seine Unlöslichkeit in Wasser (Malate [nicht alle s. S. 146]. Tartarate lösen sich nach wiederholtem Durchsaugen von Wasser).

In der Chemie werden noch folgende Reaktionen herangezogen: mit Silbernitrat (durch Umkristallisieren aus heißem Wasser Nadeln, Stäbchen, meist aber sehr kleine tropfenartige Bildungen), mit Wismutnitrat und etwas freier Salpetersäure, sowie mit Baryumchlorid (kleine Körner und Prismen).

Überall dort, wo der Gehalt an Zitronensäure ein hoher ist, wird man die direkte Sublimation heranziehen können (Tunmann¹). Ein



Fig. 41. Sublimat reiner Zitronensäure (Citraconsäureanhydrid) links. Sublimat des Fruchtfleisches der Zitrone, rechts; durch die mitgerissenen Wasserdämpfe ist das Anhydrid überwiegend in Citraconsäure übergegangen (Tunmann).

kleiner Schnitt aus dem Fruchtfleisch der Zitronen gibt mehrere Sublimate. Gewöhnlich sind am Rande der Sublimate federartige Kristallskelette und „bastfaserartige“ Formen mit abgerundeten Endflächen von Citraconsäureanhydrid, wie diese im Sublimat von reiner Zitronensäure zugegen sind. Bei der Sublimation lebender Pflanzenteile werden aber Wasserdämpfe mitgerissen, wodurch das Anhydrid überwiegend in Citraconsäure übergeht. Dieses bildet gut entwickelte Einzelkristalle (bis $40\ \mu$), die meist an Magnesiumammoniumphosphat (Sargdeckelform) erinnern, aber auch als monokline Blättchen ausgebildet sind. Letztere könnte man leicht für Itaconsäure halten, was sie aber nicht sind, da sie sich sehr leicht in Äther lösen (Fig. 41). Es erscheint angebracht, die Raphiden der Phanerogamen zu isolieren und der Sublimation zu unterwerfen.

¹ O. Tunmann, Vergl. Untersuchungen über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth. Ztg., 1912, XXVII, Nr. 52–54 u. 99.

Agaricinsäure.

Agaricinsäure, eine dreibasische Oxysäure¹⁾ (homolog der Zitronensäure), kommt zu 14–16% in den Fruchträgern von *Polyporus officinalis* Fries vor. Sie ist in Chloroform, Benzol und Wasser unlöslich, schmilzt bei 142° und bildet perlmutterglänzende Blättchen.

Über die Mikrochemie und die Lokalisation der Agaricinsäure berichtete Tunmann²⁾. Wenn man etwas Agaricinsäure des Handels unter Deckglas in einem Tropfen Wasser erwärmt, dann löst sie sich unter Schaumbildung klar auf, und beim Erkalten scheidet sich eine zähe gelatinöse Masse ab, in der Tropfen suspendiert sind, die allmählich kristallinische Beschaffenheit annehmen. Kocht man sie unter

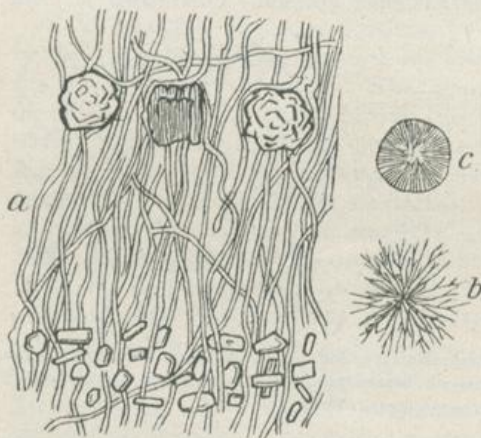


Fig. 42. *Polyporus officinalis*, a) Randschicht des Fruchträgers mit Kristallen agaricinsaurer Salze; b) Agaricinsäure des Handels oder aus dem Gewebe mit Chloralhydrat zur Kristallisation gebracht; c) ebenso erhaltene Kristalle des γ -Harzes (T) (Tunmann).

Deckglas mit wässrigem Chloralhydrat, so kristallisieren aus der Lösung federförmige, manchmal gebogene Nadeln, seltener entstehen zierliche Nadelsterne. Kocht man nun ein Präparat aus den inneren Gewebepartien des Hutes mit Chloralhydrat und kühlt schnell ab, so wird das „Harz“ in eine hyaline Masse übergeführt, aus der sich nach etwa 10 Minuten die gleichen Kristalle abscheiden. Bei vorangegangenen Zusatz von verdünnter Salzsäure fallen die Kristalle zarter und mehr baumartig

¹⁾ H. Thoms u. J. Vogelsang, Zur Kenntnis der Agaricinsäure, Pharm. Centralh., 1907, XLVIII, S. 804, dort die chem. Lit.

²⁾ O. Tunmann, Über die Bildung des Harzes, den mikrochemischen Nachweis der Harzsäuren und über die Kristalle in *Polyporus officinalis* Fries, Schw. Wehschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 11.

50% Alkohol, Ammoniak oder alkoholischer Kalilauge behandelt hat. Aus diesen Löslichkeitsverhältnissen geht hervor, daß es sich um Agaricinsäure handelt, die sich mit Chloralhydrat mikrochemisch leicht nachweisen läßt. Das Chloral wirkt hier als Kristallisationsmittel. Die Reaktion spricht dafür, daß hier die Agaricinsäure in freiem Zustande auftritt (Fig. 42b).

Außer und neben der Agaricinsäure finden sich Sphärokristalle bei der Chloralhydrateinwirkung vor. In Präparaten aus dem Inneren des Hutes finden sie sich nur spärlich, in solchen der Randschicht treten sie dagegen zahlreich auf, namentlich wenn man die rotbraunen Partien prüft (Fig. 42c). Da nun die Agaricinkristalle sich bei längerem Liegen in 90% Alkohol, besonders bei gelindem Erwärmen lösen, die Sphärokristalle aber hierbei unlöslich zurückbleiben, so läßt sich wohl annehmen, gestützt auf die makrochemischen Ermittlungen Schmieders, daß diese Sphärokristalle das γ Harz darstellen, welches demnach in größeren Mengen in der Randschicht auftritt, während die Agaricinsäure in den weißen inneren Teilen des Hutes lokalisiert ist. Letztere gibt mit Kupferazetat eine tiefgrüne, makroskopisch bereits sichtbare, Farbenreaktion. Die Färbung des „Harzes“ von *Polyporus officinalis* mit Kupferazetat kommt daher der Agaricinsäure zu. In der Randschicht des Hutes (Droge) finden sich Kristalle, die oft in regelmäßigen Reihen abgelagert sind; die großen sind bis $215\ \mu$ groß und entweder würfelförmige Gebilde, die sich aus Lamellen aufbauen, oder Drusen. Die kleinen Kristalle messen nur $8\text{--}32\ \mu$, meist $10\text{--}15\ \mu$ (Fig. 42a). Den Reaktionen und Lösungsverhältnissen zufolge handelt es sich um Magnesium- und Kaliumverbindungen der Agaricinsäure.

Sorbinsäure.

Die ungesättigte Sorbinsäure wurde in reinem Zustande 1859 von A. W. Hofmann aus dem Saft der Früchte von *Sorbus aucuparia* isoliert.

Zum Nachweis kann die Sublimation dienen. Vorteilhaft verwendet man frische (noch wasserhaltige) Schnitte völlig reifer, roter Früchte von *Sorbus aucuparia* und sublimiert bei 5 cm hoher Flamme. Nach 4–5 Minuten erhält man ungemein typisch ausgebildete Kristalle (Fig. 43a). Auch die Blättchen, die an Asparaginkristalle erinnern, sind charakteristisch. (Reine Sorbinsäure, mit einem kleinen Tropfen Wasser bedeckt, gibt bei der Sublimation die gleichen Kristalle). Die in der reifen Frucht neben Sorbinsäure vorkommenden Körper, Sorbin und Sorbit, geben keine kristallinen Sublimate. Bei Benutzung trockener Früchte erhält man zum Teil abweichende Kristallformen, da bei Wassermangel teilweise Zersetzung der Säure erfolgt.

Ist die Frucht nicht völlig reif, dann findet man in den Sublimaten Maleinsäure, umsomehr, je gelber und unreifer die Frucht ist. Maleinsäureanhydrid bildet die gleichen Täfelchen wie Sorbinsäure, löst sich aber sofort in Wasser und Essigsäure und gibt mit Silbernitrat nur Tröpfchen. Die Kristalle der Sorbinsäure des Sublimates lösen sich

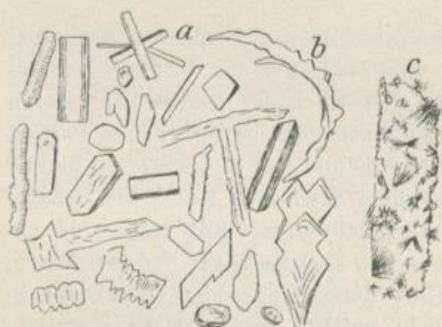


Fig. 43. *Sorbus aucuparia*. a) Sorbinsäurekristalle im Sublimat der reifen Frucht; b) Maleinsäure im Sublimat der unreifen Frucht; c) Sorbinsäurekristall bei Einwirkung von Silbernitrat (Tunmann).

leicht in Alkohol, aber unter Deckglas in Wasser, Chlorzinkjod und Jodjodkalium erst beim Kochen. Aus heißem Wasser kristallisiert sie zum Teil in Drusen und Sphäriten. Eisenchlorid löst und färbt innerhalb einer Stunde nicht. Die folgenden beiden Reaktionen habe ich als diagnostisch brauchbar befunden. Silbernitrat führt den Kristall sofort in feine Nadelchen über, schließlich entstehen kleine Drusen und Sphärite; der Umriss des ursprünglichen Kristalles bleibt mehrere Stunden erhalten (Fig. 43c). Gesättigte Brombromkaliumlösung (s. Alkaloidreag.) verwandelt den Kristall sofort in tief braungelbe, ölige, glänzende Tropfen. Von Fettsäuren, die auch in Sublimaten auftreten können (s. d.), unterscheidet sich die Sorbinsäure dadurch, daß sie sich in Kalilauge-Ammoniak löst (keine Verseifungsprodukte).

Fette Öle und Fettsäuren (Glyzerin, Akrolein, Lezithin).

Die Säuren der Fettsäurereihe und der Ölsäurereihe verbinden sich mit Glyzerin zu neutralen zusammengesetzten Äthern (Glyzeriden), die, in wechselnder Quantität miteinander gemengt, Fette (fette Öle) bilden. Die Triglyzeride der Palmitin-, Stearin- und Ölsäure (Tri-palmitin, -stearin, -olein) bilden die Hauptmasse der Fette. Die flüssigen Fette führen in erster Linie Triolein, die festeren vorzugsweise Tripalmitin und -stearin. Außerdem finden wir Glyzeride der Butter-, Valerian-, Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Myristin-, Arachinsäure, sowie Glyzeride ungesättigter Säuren aus der Reihe der Ölsäure (Tiglin-, Erukasäure), der Leinölsäure (Linolsäure) und von Oxyölsäuren (Rizinölsäure) u. a.

Die Fette zählen neben der Stärke zu den wichtigsten stickstofffreien Reservestoffen der Pflanze (Pollen, Sporen, Zwiebeln, Knollen, Wurzeln, Samen, Früchten). Bei Diatomeen sind sie das erste sichtbare Assimilationsprodukt, werden bei kräftigem Wachstum sofort verbraucht und bei Wachstumshemmung

gespeichert (Beijerinck). Geringe Mengen entstehen in Chromatophoren und Ölbildnern (s. d.), die Hauptmengen aber im Plasma (Wakker). Die Fetttropfen, oft noch von zarten mitgerissenen Plasmahäutchen umhüllt, sammeln sich später im Zellsaft an. Bei Naturhefen findet sie Henneberg in Vakuolen, bei Kulturhefen im Plasma verteilt, öfters um den Saft Raum angehäuft. Im Samen liegen Fett-Eiweiß-Emulsionen vor (Ölplasma, Tschirch). In sehr fettreichen, alten Samen trifft man zuweilen Fettkristalle an. Zur Fettbildung dienen Glykosen, Mannit u. a., hauptsächlich Stärke. Sowohl die Mobilmachung der Fette (beim Keimen) als auch ihre Bildung bei der Speicherung im Samen (S. Ivanow) wird durch Lipasen ausgeführt. Bei der Ölsynthese sind zuerst die freien Fettsäuren nachweisbar. Im Samen vertritt Fett die Stärke, schließt sie aber nicht aus. Fett und Stärke finden wir im Samen von Theobroma, Myristica, Laurus u. a. Das Fett des Fruchtfleisches (Cornus, Oleaceen, Palmen) dient auch als Anlockungsmittel für Tiere zur Verbreitung der Samen. (Eine vollständige Übersicht der Analysen der Samenfette findet sich bei Czapek, Biochemie I, S. 115.) In den Stämmen einer Anzahl einheimischer Bäume (Fettbäume, weichholzig) geht im Oktober die Stärke mehr oder weniger vollständig in Fett über, dadurch soll eine Art Kälteschutz erreicht werden; Bäume, bei denen diese Umwandlung, die übrigens auch in den wintergrünen Blättern erfolgt, nicht vor sich geht, nennt A. Fischer Stärkebäume (hartholzig). F. Weber stellt den Kälteschutz in Abrede, Fett sei nur im Vergleich zur Stärke die beständigere Form des Reservestoffes. Den Übergang der Stärkekörner in Fetttropfen konnte A. Fischer in der feuchten Kammer (Fig. 2) mikroskopisch verfolgen; dabei fand keine Translokation statt. Doch vermögen Fette im fein emulgierten Zustande und als Seifen zu wandern (R. H. Schmidt). Eine Wanderung der Fette wurde mehrfach verneint, doch machen es eigene Befunde bei Alkaloidstudien wahrscheinlich, daß Fette als Transportmittel dienen, besonders von (schädlichen) schwer diosmierbaren Stoffen.

Die mikrochemische Diagnose der Fette ist leicht in Geweben, in welchen größere Quantitäten an Fett zugegen sind, schwierig überall dort, wo, wie in den vegetativen Teilen nur einige „fettglänzende“ Tröpfchen zu identifizieren sind. Fallen bei diesen stark lichtbrechenden „Fetttröpfchen“ die Reaktionen nur zum Teil positiv aus, so kann man nach meinen Befunden auf Körpergemische schließen, die nur mehr oder weniger große Anteile von Fett enthalten. Die Diagnose stützt sich auf Ermittlung der Lösungsverhältnisse, auf Färbungen mit Fettfarbstoffen und mit Osmiumsäure, sowie auf Verseifung und Bildung von Myelin. Löslichkeitsverhältnisse und Färbungen sind Hilfsreaktionen; Verseifung und Myelinbildung, sowie Nachweis der Fettsäuren durch Sublimation sind Hauptreaktionen.

Zur Orientierung werden die Löslichkeitsverhältnisse geprüft. Die pflanzlichen Fette sind löslich in Schwefelkohlenstoff, Äther, Petroläther, Chloroform, Azeton, Holzgeist, Phenol sowie in ätherischen Ölen. Um brauchbare Ergebnisse zu erhalten, nimmt man die Reaktionen

nicht nur unter Deckglas vor (mehrmaliges Durchsaugen des Reagens) unter gleichzeitiger mikroskopischer Beobachtung, sondern mazeriert die Schnitte in einem geschlossenen Glase 1 bis 3 Tage. Um Fette aus Samen (starkwandigem Endosperm) zu entfernen, ist sogar eine 8tägige Mazeration angebracht. Von A. Meyer (Das Chlorophyllkorn, 1883) wurde zur Unterscheidung der Fette von gleichzeitig anwesenden ätherischen Ölen wässrige Chloralhydratlösung (5 g Chloralhydrat, 2 g Wasser), sowie Eisessig empfohlen. Beim Durchsaugen der Reagentien unter Deckglas bleiben die meisten Fette ungelöst (eine Ausnahme bilden die Fette der Bakterien), während sich viele ätherische Öle lösen. Doch ist zu beachten, daß letztere in Drogen oft verharzt und dann in geringer Menge dieser Reagentien schwer löslich sind. Bei Drogen sind Harze häufig unter Deckglas völlig unlöslich in Chloralhydrat und in Eisessig. Auch die Löslichkeit der Fette in großen Mengen dieser Reagentien nimmt mit dem Alter der Pflanzenteile ab. So sind die eingetrockneten Fettmassen in den Secernierungszellen mancher Epidermaldrüsen selbst bei längerem Erwärmen und bei mehrtägiger Mazeration in wässrigem Chloralhydrat unlöslich (in dem sich die Harze lösen), können aber durch alkoholische Chloralhydratlösung zum Lösen gebracht werden. Empfehlenswert ist zuweilen die Anfertigung einer größeren Anzahl von Präparaten in wässrigem und alkoholischem Chloral von steigender Konzentration, die luftdicht verschlossen (Deckglasumrandung) einer mehrtägigen Dauerbeobachtung unterworfen werden (Tunmann, Ber. pharm. Ges., 1908, XVIII, S. 503).

Fette sind unlöslich in kaltem und heißem Wasser und meist nahezu unlöslich in Alkohol. Doch werden vom absoluten Alkohol von vielen Fetten Spuren gelöst, von anderen Fetten größere Anteile, die bei der mikrochemischen Reaktion bereits ins Gewicht fallen. Leinöl wird zu 7%, Olivenöl zu fast 4%, Leindotteröl zu 7,8% gelöst und Rizinusöl und Krotonöl sind relativ leicht löslich in Alkohol. Es ist einleuchtend, daß kleine Tröpfchen, wie sie beispielsweise in den Blättern auftreten, leicht von absolutem Alkohol gelöst werden können, auch wenn sie echte Fette sind. Der Reaktion, bei der man auf die Beschaffenheit des Alkohols (absoluter, denn mit steigendem Wassergehalt sinkt die Löslichkeit der Fette) zu achten hat, kommt nur ein orientierender Wert zu.

Bei Gegenwart sehr geringer Fettmengen wird man die Beobachtung machen, daß als erste Phase der Einwirkung des Lösungsmittels die sehr kleinen Tröpfchen zu größeren Fetttropfen zusammenfließen, bevor sie in Lösung gehen. Diese Erscheinung ist allgemein für Fette typisch und erleichtert den Nachweis geringer Quantitäten.

Färbungen der Fette mit den sogenannten Fettfarbstoffen¹⁾ sind seit langem in der Mikrochemie im Gebrauch. Sie färben aber auch die Harze, ätherische Öle, verkorkte und kutinisierte Membranen. Um ein teilweises Auflösen der Fette bei der Färbung auszuschließen, darf der Alkoholgehalt der Farblösung 70% nicht übersteigen. Als Waschflüssigkeit dient 50% Alkohol, außerdem Glyzerin, in dem auch beobachtet wird. Für sich allein sind die Farbenreaktionen nicht beweisend, zumal wir nicht wissen, ob sich andere Körper organischer Natur ebenfalls färben. Doch sind die Färbungen wichtige Hilfsreaktionen.

Es ist nun vielfach Brauch aus den gefärbten Präparaten ohne weiteres Schlüsse zu ziehen. Die Färbungen sollen uns indessen in erster Linie auf die fraglichen Gebilde hinweisen, besonders kleinere Tröpfchen deutlicher hervortreten lassen. Es ist unerlässlich, an den gefärbten Präparaten die für Fette charakteristischen Löslichkeitsverhältnisse auszuprobieren, vornehmlich zu ermitteln, ob sich alle gefärbten Tropfen beim Durchsaugen von Chloralhydratlösung oder von Essigsäure nicht lösen. Lassen sich doch die Wirkungen der Lösungsmittel an gefärbten Präparaten weit klarer verfolgen als an ungefärbten.

Von den Farbstoffen haben sich Alkannin, Sudan III und Scharlach R am meisten eingeführt.

Alkannin: Der Farbstoff der Alkanna ist schon lange (s. Harze) ein beliebtes Tinktionsmittel. Zimmermann²⁾ benutzte eine konzentrierte Lösung von Alkannin in absolutem Alkohol (durch mehrtägige Mazeration hergestellt), verdünnt diese mit dem gleichen Volumen Wasser und filtriert. Die Lösung ist haltbar. Die Schnitte werden über Nacht in einem geschlossenen Behälter in dem Reagens belassen. Fette, aber auch ätherische Öle, Harze, verkorkte und kutinisierte Membranen sind alsdann tiefrot gefärbt. Doch dürfen die Schnitte aus der Farblösung nicht direkt in Glyzerin oder Wasser übertragen werden, da hierbei das überschüssige Reagens sich teils in roten Tropfen ausscheidet und Irrtümer veranlaßt, teils durch amorphe Fällungen die Präparate unklar macht. Aus der Alkanninlösung gelangen die Schnitte zunächst in 50%, dann in 30–40% Alkohol und werden nun erst in konzentriertem oder verdünntem Glyzerin untersucht.

Das in der tierischen Histologie von Daddi³⁾ empfohlene und in

¹⁾ Fettfarbstoffe sind indifferenten fettlösliche Farbstoffe oder schwache Farbsäuren und Farbbasen. Die Fettfärbung ist ein physikalischer Lösungsvorgang; hierzu vergl.: Ph. Eisenberg, Über Fettfärbung, farchemische und histologisch-technische Untersuchungen, Virchow Arch. 1910, CXCIX, S. 502.

²⁾ A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 69.

³⁾ L. Daddi, Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissus, Arch. Ital. de Biol., 1896, XXVI, S. 142.

neuerer Zeit viel gebrauchte Sudan III (Biebricher Scharlach) wurde in der botanischen Mikrochemie zuerst von Buscalioni¹⁾ benutzt zur Färbung von Harzen in Form einer alkoholischen Lösung (1:200). Der Farbstoff fand zum Fettnachweis in der tierischen Histologie Anwendung von Rosenthal²⁾, wurde zur gleichen Zeit von Tunmann³⁾ zur Differentialdiagnose von Harzen und Fetten bei den Sekretbehältern herangezogen. A. Meyer⁴⁾ gebrauchte ihn zum Fettnachweis in Bakterien. Der Farbstoff kann in nachstehender Lösung angewandt werden: 0,1 g Sudan III, 10 g Alkohol, 10 g Glycerin. Die Präparate bleiben auf 24 Stunden in der Farblösung, werden einige Stunden mit verdünntem Alkohol (50%) ausgewaschen und in Glycerin untersucht. Die Reaktion läßt sich auch unter Deckglas ausführen. Die Fette werden strohgelb bis rot (ebenso werden Harze, ätherische Öle, verkorkte und kutinisierte Membranen gefärbt). Sind feste Fette oder Fettsäurekristalle zugegen (Drogen, Kakaosamen), so tritt die Färbung nur sehr langsam ein. Schwaches Erwärmen bis zur teilweisen Schmelzung der Fettmassen beschleunigt die Farbstoffaufnahme. Nach Rieder⁵⁾ und Handwerck⁶⁾ färben sich reine Palmitin- und Stearinsäure (Kahlbaum) bei gewöhnlicher Temperatur nicht mit Sudan, sondern erst beim Schmelzen.

Gleichzeitig kam Scharlach R (Fettponceau) in Aufnahme. Dieser Farbstoff färbt in 15–30 Minuten und wird als gesättigte Lösung in 70% Alkohol benutzt. Lagerheim⁷⁾ empfahl ihn zum Nachweis fremder Fette in Schokoladen; bei tierischen Geweben wurde er von

¹⁾ L. Buscalioni, *Nuovo reatt. p. l'istol. veg.*, Malpighia, 1898, XII und: Sudan III und seine Verwendung in der botanischen Mikrotechnik, *Bot. Centralbl.*, 1898, LXXVI, S. 398.

²⁾ W. Rosenthal, *Verhandl. d. d. Patholog. Ges.*, München, 1899, II, S. 440.

³⁾ O. Tunmann, *Über die Sekretdrüsen*, Berner Dissert., Leipzig 1900, S. 11.

⁴⁾ A. Meyer, *Notiz über das Verhalten der Sporen und Fetttropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydrat*, *Centralbl. f. Bakteriöl.*, I. Abt., 1901, XXIX, S. 809.

⁵⁾ H. Rieder, *Über die Verwendbarkeit d. Farbstoffes Sudan III in der klinischen Mikroskopie*, *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, 1898, LIX.

⁶⁾ C. Handwerck, *Beiträge z. Kenntn. vom Verhalten der Fettkörper zu Osmiumsäure und zu Sudan*, *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, 1898, XV, S. 177.

⁷⁾ G. Lagerheim, *Technische Mitteilungen*, *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, 1897, XIV, S. 350 und: *Über mikroskopische Untersuchungen von Kakao und Schokolade*, *Svensk. Farm. Tidskr.*, 1902, VI, Nr. 9. Es wird Scharlach R, in Milchsäure gelöst, benutzt und bei der Unterscheidung fremder Fette im Kakao nach stattgehabtem Erhitzen der Erstarrungspunkt mit dem Polarisationsmikroskop beobachtet.

Michaelis¹⁾ und Herxheimer²⁾ erprobt. Letzterer empfiehlt eine gesättigte Lösung in 70,0 absoluten Alkohol, 10,0 Wasser und 20,0 Natronlauge; die zerstörende Wirkung der Lauge wird durch den starken Alkohol aufgehoben. Bei pflanzlichen Objekten scheint diese Zusammensetzung noch nicht gebraucht zu sein. Sie müßte eine Aufhellung der Gewebe bewirken. Hingegen habe ich in mit Scharlach gefärbten Präparaten sehr kleine Tröpfchen Fett, die der Beobachtung leicht entgangen wären, durch nachträglichen Zusatz von Schwefelsäure sichtbar gemacht. Die rötlichen Fetttröpfchen flossen zu blauen Kugeln zusammen, Scharlach löst sich nämlich in Schwefelsäure mit blauer Farbe. Die übrigen Farbstoffe haben sich nicht so allgemein eingebürgert, wie die eben genannten. Einige färben nicht nur Fette und ätherische Öle, Harze, verkorkte und kutinisierte Membranen, sondern auch noch andere Zellinhalte, zuweilen Tonerdekörper, selbst Zellkerne und Nukleinsubstanzen. Andererseits werden nicht alle Fette gefärbt. Überdies sind in vielen Fällen die erzielten Färbungen nicht genügend scharf und lassen verschiedene Deutungen und somit Verwechslungen zu. Hierher gehören Cyanin, Chlorophyllgrün, Buttergelb, Fettblau, Meyers Gelb, Brasilin, Alizarin u. a. Trotzdem wird man diese Farben in speziellen Fällen mit Erfolg benutzen können. Das neuerdings von Hell & Co. in Troppau in den Handel gebrachte Chlorophyllum bisdepuratum (eine alkoholische Lösung) erwies sich bei einigen Versuchen recht brauchbar. Cyanin, von Ranvier³⁾ zum Fettnachweis eingeführt, wird in 50% alkoholischer Lösung benutzt. Die Lösung hält sich einige Zeit in braunem Glase. Die Schnitte kommen auf 24 Stunden in die Cyaninlösung (vor Licht geschützt!), werden mit 50% Alkohol ausgewaschen und in Glyzerin untersucht. Die Öltropfen im Mesophyll der Blätter werden nur grünlich, andererseits nach Hartwich und Uhlmann (s. u.) die Zellkerne im Perikarp von „*Olea europaea*“ schön blau, das Öl nur grünlich. Hierzu muß bemerkt werden, daß selbst eine dreitägige Einwirkung der Cyaninlösung bessere Resultate nicht hervorruft. Von Orlean (Extr. Orlean. spir. spiss. Merck in Essigsäure gelöst) werden Fette gelblich gefärbt (Sonntag⁴⁾). Über weitere Farbstoffe s. Harze und unter Korkmembran.

¹⁾ L. Michaelis, Deutsch. Med. Wochenschr., 1901, XXVII, Ref. in Ztschr. f. wiss. Mikr., 1901, XVIII, S. 313.

²⁾ G. Herxheimer, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1902, XIX, S. 66. Dieser Autor empfiehlt ferner Indophenol in gesättigter Lösung in 70% Alkohol (Blaufärbung).

³⁾ Ranvier, Technisches Lehrbuch der Histologie, Leipzig 1888, S. 97.

⁴⁾ P. Sonntag, Der Orlean, ein neues Mittel zur Färbung der verkorkten und kutikularisierten Membranen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 21.

Vielfache Anwendung findet 1% Osmiumsäure, welche viele Fette braun bis schwarz färbt (infolge Reduktion). Gelindes Erwärmen beschleunigt die Reaktion. Die Färbung kann in kurzer Zeit durch Wasserstoffsperoxyd und in einigen Stunden, wie Flemming¹⁾ zeigte, durch Terpentinöl, Xylol, Kreosot und Äther wieder aufgehoben werden. Äther kann aus praktischen Gründen hierzu nicht empfohlen werden. Nun reagiert Osmiumsäure in gleicher Weise mit ätherischen Ölen, Harzen und Gerbstoffen. Letztere kann man mit Gerbstoffreagentien identifizieren, auch oft durch Mazerieren und Aufkochen mit Wasser entfernen. Doch sind nicht alle Körper, die wir unter der Bezeichnung „Gerbstoffe“ vereinen, wasserlöslich. Es empfiehlt sich die mit Osmiumsäure gefärbten Schnitte mit Vanillinsalzsäure nachzubehandeln. Dann werden diejenigen Gerbstoffe, die Phloroglucinderivate sind, leuchtend rot. Schließlich kann man vor der Behandlung mit Osmiumsäure, die Gerbstoffe mit Eau de Javelle zerstören. Die Fette werden dadurch nicht angegriffen und reagieren mit Osmiumsäure.

Die ätherischen Öle hat man aus den mit Osmiumsäure behandelten Präparaten durch Kochen der Schnitte mit Wasser entfernen wollen, ein Verfahren, das nach meinen Erfahrungen zwar häufig, aber nicht stets zum Ziele führt. Bei Drogen und getrockneten Pflanzen ist die Methode infolge teilweiser Verharzung der ätherischen Öle nicht zu benutzen und diese Verharzung erfolgt auch an lebendem Material sowohl beim Aufkochen mit Wasser, mehr noch bei längerer Aufbewahrung der Schnitte im Trockenschrank bei 100° und darüber. Zudem imprägnieren die verharzenden Terpene hierbei gerade die Fettmassen. Hingegen haben sich Wasserdämpfe zur Entfernung der ätherischen Öle (s. d.) aus Schnitten bewährt.

So ergibt sich denn folgender Gang: Die Schnitte werden nach der Behandlung mit Eau de Javelle (zur Entfernung der Gerbstoffe) Wasserdämpfen ausgesetzt und dann erst mit Osmiumsäure behandelt. Die Methode hat zur Voraussetzung Schnitte frischen (lebenden) Materials. Liegen Gemische von harzigen Balsamen, Schleimen oder ätherischen Ölen mit Fetten vor, so gestalten sich die Verhältnisse schwieriger. Doch geben in solchen Fällen die Lösungsverhältnisse an Vergleichspräparaten sowie die mikroskopischen Vergleiche, die eventuell durch genaue Zeichnungen mit dem Zeichenapparat zu unterstützen sind, Aufschluß.

Der Wert der Osmium-Reaktion auf Fette erfährt eine Einschränkung durch die Ergebnisse Altmanns, aus denen hervorgeht,

¹⁾ W. Flemming, Weiteres über die Entfärbung osmierten Fettes in Terpentin und anderen Substanzen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1889, VI, S. 178.

daß nicht alle Fette mit Osmiumsäure reagieren¹⁾. Nur freie Ölsäure und Olein wird von Osmiumsäure geschwärzt. Nachfolgende Behandlung mit Alkohol kann zur Unterscheidung beider Substanzen dienen. Mit Osmiumsäure behandelte Ölsäure löst sich in Alkohol, mit Osmiumsäure behandeltes Olein ist unlöslich in Alkohol. Andererseits reagiert Osmiumsäure nicht mit Stearinsäure und mit Palmitinsäure und ihren Triglyzeriden. Nun kommen aber in den Pflanzenfetten Gemische der Glyzeride verschiedener Fettsäuren vor, so daß wir über die Wirkung des Reagens folgendes sagen können: Jedes Fett, das sich in den Geweben direkt mit Osmiumsäure schwärzt, besteht zum größten Teile aus Ölsäure, während die Fette, welche nur gelb oder braun werden, zumeist aus Palmitin- oder Stearinsäure bestehen. Die schwache gelbe bis braune Färbung wird durch geringe Mengen an Ölsäure bewirkt. Derartige Fette werden durch Osmiumsäure schlecht fixiert und lösen sich infolgedessen leicht in ätherischen Ölen. Das braun gefärbte Fett kann bei Einwirkung von schwachem Alkohol eine schwarze Farbe annehmen.

Hiermit ist gleichzeitig ein reaktioneller Hinweis auf Lezithine²⁾ gegeben (P. Mulon³⁾), denn diese sind stets arm an Ölsäure, werden also durch Osmiumsäure schlecht fixiert, nur braun gefärbt, erst bei nachfolgendem Alkoholzusatz schwarz und von ätherischen Ölen gelöst. Dadurch finden die Angaben von Neubauer⁴⁾ Bestätigung, nach dem Osmiumsäure nur das Vorhandensein einer doppelten Bindung der C- und CH-Atome anzeigt. Tritt also bei Lezithin einmal Schwärzung mit Osmium ein, so ist dasselbe wahrscheinlich in Neurin übergegangen. Überdies soll sich Lezithin im Gegensatz zu Fett nach Behandlung mit Chromatbeizen nicht mehr mit Osmiumsäure schwärzen⁵⁾. Lezithine lösen sich (im Gegensatz zu den Fetten) nicht in Azeton (C. Deflandre, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1904, XXI, S. 47).

¹⁾ R. Altmann, Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen, I. Aufl., Leipzig 1890, S. 106 u. II. Aufl., 1894, S. 116.

²⁾ Lezithine sind fettartige Substanzen, die beim Kochen mit verdünnten Säuren oder Basen, sowie nach längerer Einwirkung von Oxalsäure in Fettsäuren, Glyzerinphosphorsäure und Cholin zerfallen. Zum Nachweis werden die Schnitte mit Formalin gehärtet, mit Alaun gebeizt, mit Alkohol und Azeton gewaschen und schließlich mit Haematoxylin, Gentianaviolett oder Methylgrün gefärbt. Auf unserem Gebiete liegen hierüber eingehende Erfahrungen nicht vor.

³⁾ P. Mulon, Action de l'acide osmique sur les graisses, Bibliogr. anat., 1904, XIII, S. 208.

⁴⁾ Neubauer, Verh. d. 72. Vers. deutsch. Naturf. u. Ärzte, Karlsbad.

⁵⁾ Colassak, zit. bei Czapek, Biochemie I, S. 105.

Die Verseifungsmethode (Molisch)¹⁾ steht beim Nachweis der Fette an erster Stelle. Vielfach wird in der Literatur angegeben, daß es mit ihrer Hilfe gelingt, sämtliche Pflanzenfette im Gewebe mikroskopisch nachweisen zu können. Demgegenüber haben langjährige Untersuchungen immer wieder von neuem dargetan, daß die Methode beim Nachweis in der Zelle und bei kleinen Mengen zuweilen im Stich läßt, auch wenn das Reagens genügend lange eingewirkt hatte. Oft kommt man dann, wenn durchführbar, durch Isolierung der Fetttropfen zum Ziele. Die Reaktion wird mit Kalilauge-Ammoniak ausgeführt. Ätzkali wird zur Entfernung des Karbonats oberflächlich mit destilliertem Wasser abgespült, dann wird eine konzentrierte wässrige Lösung bereitet, die noch etwas Ätzkali ungelöst enthält. Diese Lösung wird mit dem gleichen Volumen 20% Ammoniakflüssigkeit gemischt. Das Reagens hält sich im braunen Glasstöpselglase einige Zeit. Ein Jahr alte Lösungen waren stets zu schwach geworden. Die Präparate werden trocken auf den Objektträger gelegt, mit einigen Tropfen Lauge bedeckt und das Deckglas aufgelegt. Da nun erfahrungsgemäß die Verseifung erst nach mehreren Stunden deutlich sichtbare Erfolge verursacht, so ist es ratsam, das Deckglas mit Wachs zu umranden; dadurch wird ein Verdunsten des Reagens verhindert und Karbonatausscheidungen, die zuweilen recht störend wirken können, werden möglichst vermieden.

Es ist nun unbedingtes Erfordernis, die Präparate einer Dauerbeobachtung von mehreren Tagen zu unterziehen. Viele irrtümliche Literaturangaben sind nach eigenen Befunden nur dadurch zu erklären, daß die Präparate nicht nach 1 bis 2 Tagen gründlich durchmustert wurden. Des weiteren ist polarisiertes Licht unbedingt erforderlich. Wir können an dem Öle eines Präparates verschiedene Erscheinungen feststellen (*Elaeis*, *Amygdalus*, *Rizinus*, *Coffea* u. a. wurden eingehend mit gleichem Ergebnis untersucht). Im gewöhnlichen Lichte sehen wir zunächst, daß die Tropfen zum Teil ihr Lichtbrechungsvermögen etwas einbüßen, zum Teil ein etwas schaumiges Aussehen erhalten. Alsdann erscheinen an der Peripherie der Tropfen feine hautartige Anhängsel, die man im Anfange ihrer Entstehung leicht für plasmatische Reste halten kann. Sie färben sich aber nicht mit Jod und der weitere Verfolg lehrt, daß in ihnen Anfangsstadien der Seifenkristalle vorliegen. Nach 1 Tage sind die Seifen deutlich ausgebildet; sie leuchten bei gekreuzten Nicols im allgemeinen nur wenig auf und sind dadurch von den lebhaft und farbig aufleuchtenden Kali-

¹⁾ H. Molisch, Grundriß einer Histochemie der pflanzlichen Genußmittel, Jena 1891, S. 10.

kristallen leicht zu unterscheiden. Einige Tropfen sind ganz in Kristalle übergegangen, andere erscheinen ganz hyalin und ihr Umriß ist durch einen Kranz von Seifennadeln gekennzeichnet. Die zentrale Partie weiterer Tropfen besitzt noch starkes Lichtbrechungsvermögen und nur am Rande sind Kristalle. Die gebildete Seife hat den inneren Teil des Tropfens vor der weiteren Wirkung der Lauge geschützt. Hier und da sind selbst bei völlig in der Ruhe belassenen Präparaten die Seifenkristalle durch Strömungen von den Tropfen fort und an fettfreie Stellen des Präparates geschwemmt (Fig. 44). Außerdem finden wir und zwar an dem gleichen Präparate Tropfen, die durch einen mehr oder weniger deutlichen Kreis eine Schale oder einen Hof erkennen lassen. Diese Tropfen zeigen in polarisiertem Lichte das bekannte dunkle Kreuz (besonders charakteristisch!), wodurch bei schwacher Vergrößerung leicht die Anwesenheit von Stärke vorgetäuscht wird. Doch ist eine Verwechslung mit Stärkekörnern bei Dauerbeobachtung ausgeschlossen (Wirkung der Lauge). Nach 4 bis 5 Tagen wird man nach Tropfen mit dem dunklen Kreuz vergeblich suchen. Sie haben inzwischen nur selten Seifenkristalle gebildet, sondern zeigen in den meisten Fällen am Rande Myelinformen (s. S. 164), die oft nur an einer Seite des Tropfens ausgebildet sind. Die Größe der Tropfen ist auf die verschiedenen Erscheinungen nur von geringem Einfluß. Da die Erscheinungen bei allen Objekten in gleicher Weise auftreten, so kann auch die chemische Zusammensetzung der Öle ebenfalls nicht die Ursache sein, weshalb nur bei einzelnen Tropfen Myelinbildung erfolgt.

Nun gibt allerdings Kalilauge-Ammoniak auch mit anderen Substanzen kristallinische Reaktionsprodukte. Diese sind jedoch über das ganze Gesichtsfeld verteilt (Alkaloide) oder von gänzlich abweichenden Formen (Weinsäure). Überdies treten die Verseifungsprodukte erst nach mehreren Stunden, oft erst nach 1 Tage, klar hervor, während Alkaloide u. a. mit der starken Lauge schon in sehr kurzer Zeit reagieren.

Hartwich und Uhlmann¹⁾ haben den Verseifungsprozeß bei folgenden chemisch reinen Ölen verfolgt: Oliven-, Mandel-, Pfirsichkern-, Arachis-, Lein-, Mohn- und Rizinusöl und beschreiben die Produkte, die mit der Lauge sowie mit



Fig. 44. *Elaeis guineensis*, Öltropfen, 20 Stunden in Kalilauge-Ammoniak, die verschiedenen Stadien der Verseifung zeigend (Tunmann).

¹⁾ C. Hartwich und W. Uhlmann, Über den Nachweis fester Öle durch mikrochemische Verseifung, Arch. d. Pharm., 1903, CCXLI, S. 111.

$\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{3}$ verdünnter Lauge entstehen. In gleicher Weise untersuchten sie freie Ölsäuren. Palmitin-, Stearin-, Laurinsäure geben kurze Nadeln, Arachinsäure bildet dicke kurze Nadeln und Platten, Ölsäure kurze Nadeln und Sphärite.

Myelinbildung. Als Myelinformen (Virchow) bezeichnet man durch Einwirkung von Alkalien aus Fetttropfen entstandene, gewissermaßen herausgeschleuderte Gebilde, die die verschiedensten Formen besitzen (vergl. Fig. 45), schließlich Kugeln und Kränze abschnüren, im polarisierten Lichte aufleuchten und zu den flüssigen Kristallen zählen (Adami und Aschoff). Nach dem Eintrocknen resultieren sehr kleine, unvollkommen kristallinische Gebilde. Früher schrieb man die Fähigkeit, Myelinformen zu bilden, ausschließlich dem Cholesterin zu (Beneke), was von Köhler bezweifelt wurde. Nestler¹⁾ führt die Myelinbildung

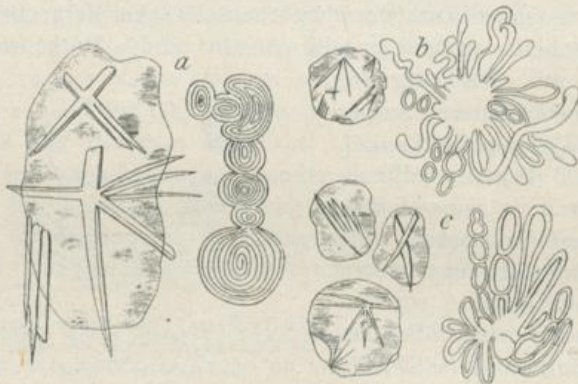


Fig. 45. Sublimationstropfen mit Fettsäurekristallen nebst zugehörigen Myelinformen, a) von *Areca catechu*, b) von *Illicium religiosum*, c) von *Elaeis guineensis* (Tunmann).

des Sekretes von *Capsicum annum* auf Ölsäure zurück und Senft²⁾ kam zu dem Ergebnis: „ohne Fettsäuren keine Myelinformen“; er erhielt sie wenigstens mit reiner Öl-, Leinöl-, Eruka-, Kaprin-, Kaprylsäure.

Die Myelinbildung innerhalb der Zelle gelingt nicht immer und nicht gut, die schönen Formen können in der engen Zelle gar nicht zur Entwicklung gelangen. Die Fette müssen isoliert werden. Vielfach (bei zarten Objekten, niederen Pflanzen, Sekretdrüsen) genügt ein Druck auf das Deckglas, um die Tropfen in Freiheit zu setzen³⁾, bei stärkeren

¹⁾ A. Nestler, Myelin- und Eiweißkristalle in der Frucht von *Capsicum annum*, Sitzber. Wien. Akad., 1906, CXV, Abt. 1, S. 477.

²⁾ Em. Senft, Über die Myelinformen bildende Substanz im Gingkosamen, Pharm. Post, 1907, XL, Sep.

³⁾ A. Nestler, Das Sekret der Drüsenhaare der Gattung *Cypripedium*, Ber. deutsch. bot. Ges., 1908, XXV, S. 554.

Präparaten ein Zerzupfen, bei Gegenwart größerer Mengen ein Herausheben mit der Nadel. Auf die isolierte Substanz läßt man 1—10% Ammoniak oder Kalilauge einwirken. Selbst saures phosphorsaures Natrium kann herangezogen werden (Senft). In anderen Fällen müssen starke Laugen benutzt werden (*Salvia glutinosa*), besonders bei Gemischen; die Konzentration der Lauge muß daher von Fall zu Fall modifiziert werden. Die Myelinformen entstehen bald, oft sofort, sind mehrere Stunden beständig und werden beim Eintrocknen der Flüssigkeit undeutlich. Um sie einige Tage zu erhalten, werden die Reaktionen im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen und die Deckgläser mit Vaseline luftdicht verschlossen. Die Myelinformen speichern Anilinfarbstoffe; vorteilhaft gebraucht man Ammoniak, das mit Safranin, Methylenblau u. a. gefärbt ist. Bei Zusatz von Essigsäure oder von konz. Kochsalzlösung ziehen sich die Formen ein oder ballen sich zu Klumpen und Kugeln zusammen. Nun konnte aber Nestler bei *Cocos nucifera* und bei *Elaeis guineensis* weder mit den Präparaten noch mit dem Rückstand des Ätherauszuges Myelinformen erzielen. In derartigen Fällen muß man zur Sublimation greifen (Tunmann¹⁾). Wie Fig. 45 zeigt, erhält man mit Schnitten von *Elaeis*, *Cocos*, *Areca catechu*, *Illicium* u. a. Sublimate, die aus Tropfen bestehen, die bei gekreuzten Nicols aufleuchten und aus denen sich nach wenigen Minuten schön ausgebildete Kristalle (Fettsäuren) ausscheiden²⁾. Zuweilen erstarrt der ganze Tropfen zu einer kristallinen Masse. Nun läßt sich feststellen, daß die Myelinformen in den Sublimaten zuerst aus den flüssig gebliebenen Anteilen der Tropfen entstehen und daß die Kristalle weit schwieriger zur Myelinbildung schreiten. Bedeckt man das Präparat mit dem Deckglase, dann lösen sich bei mehrfachem Durchsaugen von Petroläther die flüssigen Anteile auf, während die Kristalle nicht oder doch erst nach längerer Zeit etwas angegriffen werden. Die flüssigen Anteile stellen demnach die flüssigen unge-

¹⁾ O. Tunmann, Zur Mikrochemie der Arekanuß, Pharm. Post, 1911, XLIV, S. 703 und: Zur Mikrochemie und Mikrosublimation einiger Methanderivate, Apoth. Ztg., 1912, XXVI, S. 983.

²⁾ Abscheidungen von Kristallen in „fettartigen“ Tropfen der Sublimate dürfen nicht ohne weiteres als Fettsäuren gedeutet werden, da sich Alkaloide an gleicher Stelle abscheiden. Die Fettsäurekristalle zeichnen sich jedoch durch ihre Größe, ihre typische Gestalt und ihr reaktionelles Verhalten aus. In den sublimierten Tropfen von *Linum*, *Theobroma*, *Rizinus*, *Amygdalus* (Schnitte der Samen) scheiden sich Kristalle meist nicht oder erst nach längerer Zeit aus; hingegen erstarren die Fettsäuren im Sublimat des Endosperms von *Anamirta paniculata* sofort kristallinisch (für diese Kristalle konnte L. Frank, Zeitschr. Nahr.- u. Genm., 1903, VI, S. 888, keine Deutung beibringen).

sättigten Fettsäuren dar, bei ihnen erfolgt die Myelinbildung weit leichter als bei den kristallinen Fettsäuren. Bei weiteren Untersuchungen wird auf Phytosterinen zu achten sein.

Wo mithin Myelinbildung an Fetten in den Präparaten oder im isolierten Zustande nicht gelingt, da greifen wir zur Sublimation. In den Sublimationstropfen gelingt die Myelinbildung stets, wobei es ohne Bedeutung ist, ob sich die Fettsäuren kristallinisch abscheiden oder nicht. Bei der Sublimation hat nicht nur gewissermaßen eine Reinigung der Fette von fremden Beimischungen, sondern vor allem eine mehr oder weniger vollständige Abspaltung von Fettsäuren stattgefunden, so daß die Alkalien leichter auf die für die Myelinbildung allein in Betracht kommenden Bestandteile der Fette, auf die Fettsäuren, einwirken können.

Allerdings geben nach Czapek¹⁾ auch konz. Tanninlösungen Myelingeilde. Gerbstoffe können (Areca catechu) sowohl in den ersten rein weißen als auch in den späteren, gelblichen Sublimaten zugegen sein. Sie werden durch Eisenchlorid braunschwarz, gehen beim Erwärmen in tiefschwarze Tropfen über. Beim Erwärmen werden die Fettsäuren geschmolzen, scheiden sich aber beim Erkalten (neben den schwarzen Gerbstofftropfen) wieder farblos, ev. in kristallinischem Zustande, ab. Eine Verwechslung von Gerbstoff und Fettsäuren ist in den Sublimaten unmöglich.

Während wir mit Verseifung und Myelinbildung die Fettsäuren sicher nachweisen können, ev. erst nach erfolgter Reinigung mittels Mikrosublimation, gelingt der Nachweis des **Glyzerins** in Schnitten nicht. Bei der Mikrosublimation tritt bei höherer Temperatur zuweilen Akrolein-geruch auf; es hat eine Zersetzung stattgefunden. Man erhält dann im Sublimat (falls die Dämpfe nicht gänzlich entwichen sind) mit Anilin einen amorphen braunen Niederschlag und kann auch nach Behrens²⁾ prüfen mit einer wässrigen Lösung von salzsaurem p-Nitrophenylhydrazin, die mit einem Tropfen Essigsäure angesäuert ist (orangefarbene Sternchen, die aus bis 150 μ langen Nadeln zusammengesetzt sind). Auch Blaufärbung mit Piperidin und Nitroprussidnatrium (Lewin) zeigt Akrolein an. In Sublimaten, in denen andere, uns unbekannte Körper zugegen sind, ist diese Reaktion aber ebenso wenig beweisend, wie die in der Kälte eintretende Reduktion mit ammoniakalischer Silbernitratlösung. Zum Nachweis von Glyzerin im Gewebe geben reife Samen

¹⁾ Fr. Czapek, Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen und einige Anwendungen derselben, Ber. deutsch. bot. Ges., 1910, XXVII, S. 147.

²⁾ H. Behrens, p-Nitrophenylhydrazin als mikrochemisches Reagens, Chem.-Ztg., 1903, XXVII, S. 1105.

das beste Material. Wässrige Lösungen von Glycerin versetzt Behrens¹⁾ im Proberöhrchen mit etwas langfaserigem Asbest und Kaliumhydro-sulfat, erhitzt und stellt den Akroleingeruch fest.

In konz. Schwefelsäure sind Fette und ätherische Öle unlöslich. Bei Abwesenheit letzterer kann man durch Schwefelsäure die Präparate zerstören, wobei die Fetttröpfchen hervortreten und zu größeren Tropfen ineinanderfließen. Bei Zusatz von Schwefelsäure und Osmiumsäure nehmen die sich ansammelnden Tropfen braunschwarze Färbung an. Die Reaktion läßt sich zum Nachweis sehr kleiner Fettmengen verwenden. Doch muß die Fettnatur durch andere Reagentien sicher-gestellt sein. So kann man Pollen und Sporen mit Schwefelsäure-Osmiumsäure behandeln und durch einen Druck auf das Deckglas die Körner zum Platzen und das Fett zur Anschauung bringen.

Salzsäure in Dampfform wurde von Mesnard²⁾ zur Differential-diagnose von ätherischem Öle und Fett herangezogen (Ausführung der Reaktion s. äth. Öle). Die Schnitte werden in stark zuckerhaltigem Glycerin den Dämpfen einer konz. Salzsäure ausgesetzt, ätherische Öle verschwinden bald. Dauert nun die Einwirkung der Salzsäure-Dämpfe 1—1½ Tage, dann ist der gesamte Zellinhalt bis auf das Fett zerstört. Das Fett hat sich in einigen Tropfen angesammelt. Kurze Einwirkung (2 Sekunden) von Joddämpfen färbt die Tropfen goldgelb, so daß sie sich sehr scharf abheben. Wird nun der Durchmesser der Tropfen ge-messen, dann läßt sich leicht die im Schnitte enthaltene Fettmenge berechnen. Salpetersäure, salpetrige Säure und ihre Dämpfe können gleichfalls benutzt werden. Bei diesen Reaktionen mit Säuren, sowie bei einer Anzahl weiterer Reaktionen treten Färbungen ein, die aber sämtlich nur mit Schnitten der Samen und anderer fettreicher Gewebe ausführbar sind. So wird, um nur einige Beispiele anzuführen, mit rauchender Salpetersäure das Fett der bitteren Mandel indigoblau, von Pfirsichen orange-gelb, von Kriechenfrüchten blaugrün, von Aprikosen gelb³⁾. Bei diesen Fetten sind die Farben auch mikroskopisch in den Schnitten gut zu erkennen; ob dies auch bei anderen Reaktionen der Fall ist (molybdänschwefelsaures Natrium, aromatische Aldehyde mit Salzsäure, Formalinschwefelsäure u. a.) muß noch näher ermittelt werden.

Lehrreich sind die Versuche Fischlers⁴⁾ im tierischen Gewebe den Fetten

¹⁾ H. Behrens, Beiträge zur mikrochem. Analyse organischer Verbindungen I, Chem.-Ztg., 1912, XXVI, S. 1125.

²⁾ E. Mesnard, Recherches sur la localisation des huiles grasses dans la germination des graines, Compt. rend., 1893, CXVI, S. 111.

³⁾ H. V. Rosendahl, Svensk. Farm. Tidskr., Jan. 1907, XI.

⁴⁾ F. Fischler, Über die Unterscheidung von Neutralfetten, Fettsäuren und Seifen in Geweben, Zentralbl. f. Pathol. u. pathol. Anatom., 1904, XV, S. 913.

mikrochemisch nachzugehen und den Auf- und Abbau von Fett zu verfolgen. Die Spaltungsprodukte (freie Fettsäuren, fettsaure Salze, Seifen) müssen dann an Ort und Stelle nachgewiesen werden. Die Gewebe werden mit reiner konzentrierter Kupferazetatlösung behandelt. Die freien Fettsäuren bilden palmitin-, stearin- oder oleinsäure Kupfersalze, die mit Weigertschem Haematoxylin Lacke bilden, welche in Weigertscher Differenzierungsflüssigkeit¹⁾ fast unlöslich sind. Um die Seifen (Kalium- und Natriumsalz der Fettsäuren) nachzuweisen, sind diese erst in unlösliche fettsaure Salze überzuführen, da sonst die Seifen leicht in die Fixierungsflüssigkeit übergehen. Die Überführung wird durch salizylsaures Kalzium bewirkt. Die auf Seifen zu untersuchenden Gewebestücke werden mit 10% Formollösung fixiert, der bis zur Sättigung salizylsaures Kalzium zugesetzt ist. Darauf folgt wiederum Verkupferung mit Kupferazetat und Kupferlackbildung mit Haematoxylin. Vergleichspräparate zeigen nun, ob neben freien Fettsäuren noch Seifen im Gewebe zugegen sind.

Zum Nachweis der Fette in Bakterien (*B. tumescens*) benutzt A. Meyer²⁾ Sudan III (rot) und Dimethylamidoazobenzol (gelb). Letzterer Farbstoff wurde schon von Michaelis gebraucht, Kohl färbte die Fette der Cyanophyceen damit. Gute Erfolge geben Doppelfärbungen mit Methylenblau einerseits und den beiden Farbstoffen anderseits. Von Eau de Javelle werden die Fetttropfen schwer angegriffen, lösen sich hingegen leicht in starker Chloralhydratlösung (5 g auf 2 g Wasser). Nach Unna leistet bei Bakterienfetten Osmiumsäure gute Dienste und Czaplewski³⁾ führt Scharlach R., Alkannin und Cyanin ebenfalls als brauchbar an. Als neue Methode führte A. Meyer⁴⁾ Färbung mit Naphtholblau ein. Das Reagens muß stets frisch bereitet werden aus einigen Tropfen einer filtrierten wässrigen 1% Lösung von Dimethylparamethyldiamin und gleichviel Tropfen von α -Naphthol in 1% Soda-lösung.

In den höheren Pilzen sammelt sich das Fett oft in großen Tropfen an, so in den Sklerotien (von *Claviceps purpurea*) und in Conidien. Myelinbildung gelingt in den Hyphen mit 10–15% Ammoniak, Verseifung selbst außerhalb des Gewebes schlecht und nicht immer, besser im Sublimat, in dem sich auch Fettsäurekristalle finden.

Über das Fett der Fettzellen der braunen Parmelien, das Zukal als Reservestoff, Fünfstück als Exkret betrachtet, hat Rosendahl⁵⁾

¹⁾ Ferricyankalium 2,5, Borax 2,0, Wasser 100.

²⁾ A. Meyer, Notiz über das Verhalten der Sporen und Fetttropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydratlösung, Centralbl. f. Bakt., 1901, Abt. I, XXIX, S. 809.

³⁾ Czaplewski, Ztschr. f. wiss. Mikr. 1901, XVIII, S. 495.

⁴⁾ A. Meyer, Naphtholblau als Reagens für Bakterienfett, Centralbl. f. Bakt., 1904, Abt. I, XXXIV, S. 578.

⁵⁾ H. V. Rosendahl, Vergleichend-anatomische Untersuch. über die braunen Parmelien, Nov. act. Leop.-Car., 1907, LXXXVII, S. 401.

eingehende Angaben gemacht. Nach Bachmann¹⁾ kommen Ölzellen nicht nur bei Kalkflechten, sondern auch bei allen granitbewohnenden Flechten vor. Ihr Inhalt wird mit Alkanna rot. Besser eignet sich Osmiumsäure, da die Färbung selbst bei kleinsten Tropfen bestehen bleiben soll. Alkannatinktur durchdringt zudem die Zellwände nur sehr langsam. Bei *Sphyridium byssoides* tritt zunächst ein eiweißartiger Stoff auf und erst im Alter ist „ein dem Eiweiß eingebettetes Fettkügelchen zu erkennen“ (a. a. O. S. 12). Bachmann berechnet auch die Anzahl der Ölzellen bei einigen Granitflechten.

In Acetabularien (Sporen, Schirmen) kommen rote Pigmenttröpfchen vor (Woronin, de Bary, Leitgeb²⁾), die sich beim Einlegen der Algen in Alkohol teils in Körnchen, teils kristallinisch (Blättchen, Stäbchen, oft zu Aggregaten vereinigt) abscheiden. Sie lösen sich in Alkohol und in Äther, werden von Schwefelsäure vorübergehend blau gefärbt und durch Kalilauge beim Erwärmen in rote Tröpfchen übergeführt und für eine fettartige Substanz gehalten, die den Farbstoff führt. In Peridineen hat Schütt³⁾ Fettplatten (Osmiumsäure) angetroffen, die ebenfalls weiter zu studieren wären.

Bei den höheren Pflanzen gibt es noch viele „Fett- und Ölkörper“, deren Studium noch nicht abgeschlossen ist. Hierher zählen die von Radlkofer⁴⁾ Monteverde⁵⁾, Solereder⁶⁾, Zimmermann⁷⁾ beschriebenen kugligen Gebilde, die in den Blättern (Mesophyll) vieler höherer Pflanzen beobachtet wurden (Cinchoneen, Combretaceen, Cordiaceen, Gaertneraceen, Gramineen, Rubiaceen, Sapindaceen, Sapotaceen u. a.). Die Gebilde liegen oft in der Einzahl in der Zelle, erreichen bisweilen Chloroplastengröße (2–15 μ), sind meist isotrop, vereinzelt doppelbrechend. Die Doppelbrechung verschwindet bei Gramineen, wenn man die Präparate in Wasser auf 50–55° C erwärmt. Sie geben

¹⁾ E. Bachmann, Die Rhizoidenzone granitbewohnender Flechten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1907, XLIV, S. 1. Vergl. auch Stahlecker, Untersuchungen über Thallusbildung und Thallusbau in ihren Beziehungen zum Substrat bei siliciseden Flechten, Dissertation, Stuttgart 1905.

²⁾ H. Leitgeb, Die Inkrustation der Membran von Acetabularia, Sitzber. Wiener Akad., 1887, XCVI 1, S. 15.

³⁾ F. Schütt, Sitzber. Berl. Ak., 1892, S. 377.

⁴⁾ L. Radlkofer, Z. Klärung v. Theophrasta u. d. Theophrasteen, Sitzb. Münchener Akad., math.-phys. Klasse, 1889, XIX, S. 221.

⁵⁾ N. A. Monteverde, Üb. d. Ablagerung von Kalzium- u. Magnesiumoxalat in d. Pflanze, Bot. Zentralbl., 1885, XLIII, S. 327.

⁶⁾ H. Solereder, Studien über d. Tribus d. Gaertnereen, Ber. d. bot. Ges., 1890, VIII, S. 71.

⁷⁾ A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik 1892, S. 206.

Fettreaktionen, mit dem Verseifungsverfahren aber keine Seifenkristalle (Zimmermann). Auch in ihren Lösungsverhältnissen zeigen die Tropfen, selbst bei nahestehenden Pflanzen, ein verschiedenes Verhalten. Die Öltropfen der Nadeln von *Abies sibirica* lösen sich leicht in wässriger Chloralhydratlösung, die in *Taxus baccata* sind nach Rywosch¹⁾ darin unlöslich. Für die Verschiedenheit der Bildungen spricht ferner der Befund, daß die Tropfen von *Abies* durch Kochen mit Wasser vertrieben werden können, trotzdem sie bei der Verseifung Seifenkristalle geben, die von *Taxus* aber nicht. Ferner fand Monteverde in Gramineen ölartige Tropfen, die hauptsächlich aus Harz bestehen sollen (?), trotzdem sie sich nach seiner Angabe mit Alkanna nicht färben. In all diesen Bildungen liegen jedenfalls Gemische verschiedener Körper mit wechselnden Mengen fettartiger Anteile vor.

In den Chromatophoren ziemlich verbreitet sind kleine stark lichtbrechende Tröpfchen, die gewöhnlich als Öltropfen bezeichnet werden. Ihr reaktionelles Verhalten weist teils auf Fette, teils auf ätherisches Öl hin, ja es ist nicht ausgeschlossen, daß wir in diesen Tröpfchen weder Fette noch ätherische Öle vor uns haben, sondern Substanzen unbekannter Natur (Aldehyde?). Vielfach liegen in den Tropfen keine reine Substanzen, kein reines Fett u. dergl., vor, sondern Gemische verschiedener Körper. Darauf deutet bereits ihr Verhalten gegen Chloralhydratlösung hin, in der sie teils leicht, teils schwer löslich sind. In Wasser und Essigsäure sind sie unlöslich, hingegen leicht löslich in Äther und Alkohol (selbst in verdünntem). Sie speichern Fettfarbstoffe und bräunen sich langsam mit Osmiumsäure. Die Tropfen in den Chromatophoren alter Blätter führen auch Zersetzungsprodukte des Chlorophyllfarbstoffes.

Die von den älteren Autoren als Bläschen angesprochenen, bis 50 μ großen Gebilde im Milchsafte der Blätter von *Musa chinensis*, die Trécul²⁾ für Kautschuk hält, sind nach Molisch³⁾ Fett. Sie sind teils dünnflüssig, teils von zäher Konsistenz. Letztere sollen einen deutlichen Kern, konzentrische Schichtung und eine Membran zeigen, also kristallinischer Natur sein. Sie schrumpfen in Alkohol ohne zu verschwinden, lösen sich leicht in Chloroform, Äther, Schwefelkohlenstoff, Benzol, färben sich mit Osmiumsäure (schwarz) und mit Alkanna-

¹⁾ S. Rywosch, In grünen Zellen vorkommendes Öl und seine Beziehung zur Herbstfärbung, Ber. d. bot. Ges., 1897, XV, S. 199.

²⁾ A. Trécul, Des vaisseaux propres et du tannin dans les Musacées, Ann. d. sc. nat., 1867, 5. Sér. VIII, S. 283.

³⁾ H. Molisch, Über Zellkerne besonderer Art, Bot.-Ztg., 1899, LVII, S. 177.

tinktur (rot). Über die Verseifungsergebnisse berichtet Molisch nicht. Auch A. Meyer (Chlorophyllkorn) kommt auf die Natur der „Öltropfen“ der Musaceen zu sprechen; da sie sich leicht im Weingeist, Chloralhydrat und Äther lösen, so scheinen sie keine Fette zu sein.

Das im Innern der Gewebe auftretende sog. Wachs (s. auch Membranwachs) gehört fast stets zu den Fetten, so das Wachs der Rhus-Früchte (Japanwachs), das richtiger als **Japantal** zu bezeichnen ist. Es besteht hauptsächlich aus Fettsäuren (E. Tassilly, Bull. Soc. Chim., 1911, IX, S. 608), in dem Unverseifbaren (nur 0,68%) finden sich Myricylalkohol, Phytosterin, Cerylalkohol u. a. (H. Matthes und W. Heintz, Arch. d. Pharm., 1909, CCXLVII, S. 650). Der Japantal der Rhusfrüchte wird von Tauben gefressen, ist also Anlockungsmittel und dient der Verbreitung der Samen (Moebius¹). Die ersten „Wachskörnchen“ entstehen innerhalb des Plasmaschlauches chlorophyllfreier Zellen², zu ihrer Bildung wird Stärke verbraucht (A. Meyer³). Im Embryo hat das Fett noch normale Konsistenz und dient als Reservestoff. Erst im Mesokarp der reifenden Frucht nimmt es wachsartige Konsistenz an und lagert sich als weiße Krusten den Zellwänden an (Tabata³). Es löst sich in Terpentinöl (Moebius), aber nicht in kaltem Alkohol und kaltem Äther, wird von Mineralsäuren nicht angegriffen und läßt sich mit Kalilauge verseifen (A. Meyer). Das Rhus-Wachs leuchtet (im Gegensatz zu den Membranwachsen) im polarisierten Lichte nicht auf.

Phytosterine.

Die Phytosterine (hochmolekulare, einwertige Alkohole, O. Hesse) stehen den Cholesterinen des Tierkörpers sehr nahe und kommen in geringer Menge in allen plasmahaltigen Zellen vor; in größerer Menge finden sie sich in den fett-haltigen Zellen sowohl in höheren als niederen Pflanzen (Rinden, Blüten, Samen, Sklerotien). In Sekreten scheinen sie häufig zugegen zu sein. Eine große Anzahl hierher gehörender Körper ist bisher isoliert worden (Phytosterin aus Physostigma, Pisum, Coffea, Colchicum, Soja, Ergosterin aus Mutterkorn, Paracholesterin aus Aethalium septicum, Lupeol aus Lupinus luteus; vorzüglich aus Leguminosen sind phytosterinartige Alkohole bekannt, ferner das Quebrachol aus Quebracho und viele andere, doch ist die Chemie mancher Phytosterine noch nicht völlig geklärt).

¹) M. Moebius, Wachsausscheidungen im Innern von Zellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XI, S. 445.

²) A. Meyer, Über die Entwicklung des Wachses der Frucht von Rhus toxicodendron, Arch. d. Pharm., 1879, CCXVII, S. 514.

³) S. Tabata, Über die Früchte und Keimpflanzen von Rhus succedanea L., Journ. of Coll. Univ. Tokyo, 1907, XXIII, S. 1.

Im isolierten Zustande bilden die Phytosterine perlmutterglänzende Blättchen von verschiedener Form (Rechtecke, oft mit abgestutzten Ecken oder schiefgestellten Enden und sechseckige Täfelchen), die gerade auslöschten (Cholesterinkristalle bilden viereckige rhombische Täfelchen). Sie können von den Fetten durch Verseifung getrennt werden, bleiben in dem Unverseifbaren der Fette zurück, aus dem sie durch Ätheralkohol gewonnen werden. Ihre Lösungsverhältnisse stimmen im wesentlichen mit denen der Fette überein; sie lösen sich in Äther, Chloroform, Alkohol, Ätheralkohol, heißer wässriger und in kalter alkoholischer Chloralhydratlösung. Aus heißem Anilin scheiden sie sich sofort wieder aus, zum Teil in nadelförmigen Gebilden, die strauchartig oder zu Sternen angeordnet sind (Fig. 46a).

Die Phytosterine geben (ebenso wie die Cholesterine) einige Farbenreaktionen, die in der Chemie zur Erkennung herangezogen werden. Es sind folgende: Schwefelsäure löst nur zum Teil und färbt



Fig. 46. a) Phytosterinkristalle, aus den großen Kristallen des Handelspräparates mit Alkohol am Objektträger umkristallisiert. b) *Nicotiana tabacum* (Epidermis, altes Glycerinpräparat), hellrote Kristalle, die Phytosterinreaktion geben (Tunmann).

meist intensiv blutrot¹⁾ (Ergosterin löst sich völlig und ohne Färbung). Trichloressigsäure (9 + 1 Teil Wasser) färbt hell- bis rotviolett, vornehmlich nach Erhitzen oder bei Zusatz von Salzsäure. Die Chloroformlösung wird bei Zusatz von Schwefelsäure blutrot. Die Lösung in Essigsäureanhydrid wird durch Schwefelsäure vorübergehend rosenrot, dann blau. Viele Phytosterine werden durch Schwefelsäure rot gefärbt, fügt man etwas Jod zu, dann entsteht eine violette, blaue, schließlich eine rötliche Färbung. Diese Reaktionen sind für unsere Zwecke in erster Linie geeignet. Essigsäureanhydrid hat

die unangenehme Eigenschaft, breit zu laufen, so daß das Arbeiten am Objektträger schwierig ist. Bringt man auf einige Splitter von reinem Phytosterin einen Tropfen Schwefelsäure, läßt darauf etwas Chloroform fallen und bedeckt mit dem Deckglase, dann sind die Chloroformtropfen in kurzer Zeit rosenrot, nach längerer Zeit braunrot gefärbt. Fügt man zu dem die Phytosterinkristalle führenden Schwefelsäuretropfen seitlich eine Spur Jodjodkalium zu, so erfolgt (neben Jodausscheidungen) eine intensive jodstärkeblaue Färbung der Kristalle, die schließlich in Gelbbrot bis Rotbraun übergeht.

¹⁾ Bei dem mir zur Hand stehenden Phytosterin wurden alle Teilchen mit Schwefelsäure sofort rot und gingen in schaumige Massen über; nach 3—4 Stunden waren fast alle Partikelchen olivgrün (bei durchfallendem Lichte), nach längerer Zeit trat Entfärbung ein und ein Teil der Massen hatte sich unter Zurücklassung einer Haut gelöst.

Scherer¹⁾, welcher der Ansicht ist, daß Angaben über den Nachweis in der Pflanzenzelle noch nicht vorliegen (siehe aber weiter unten), hält „die bisher bekannten Reagentien für Phytosterine“ zum mikroskopischen Nachweis für ungeeignet.

Bei der Sublimation liefert Cholesterin (Handelspräparat) sofort gut ausgebildete Kristalle (Täfelchen), während Phytosterin ein aus rundlichen und langgestreckten glänzenden Tropfen (flüssige Kristalle) bestehendes Sublimat bildet; in den Tropfen sind erst nach längerer Zeit in polarisiertem Lichte vereinzelte Kristalle zu erkennen. Der Nachweis der Phytosterine im Gewebe ist nicht leicht und gelingt selbst in Schnitten der Samen nicht gut; bessere Erfolge erhält man, wenn man einige Präparate sublimiert und die öligen Präparate nach eintägigem Liegen mit Schwefelsäure-Chloroform prüft. Weit schwieriger gestaltet sich der Nachweis in vegetativen Geweben. Er kann mit einiger Aussicht auf Erfolg nur dort geführt werden, wo größere Mengen Phytosterine zugegen sind. In Herbarmaterial und in Pflanzen, die einige Zeit in 60–70% Alkohol verweilt haben, kommt es zuweilen zur Abscheidung von Kristalltäfelchen und -nadeln, welche die Chloroform-Schwefelsäurereaktion geben. Derartige Kristalle speichern Farbstoffe und erscheinen oft in gelben bis braunroten Farben (Fig. 46 b).

Werden fetthaltige Präparate längere Zeit in Glyzerin aufbewahrt, dann scheiden sich in den Öltropfen bisweilen Kristalle aus. Sie werden teils als Fettsäure- teils als Phytosterinkristalle angesprochen (Bertrand). Auch beim Einlegen von Präparaten der Blütenblätter (*Calendula* off., *Gazanea splendens*, *Silphium perfoliatum*) in alkoholische Kalilauge bilden sich in den Öltropfen Kristalle, die Kohl²⁾ für Phytosterinsphärite hält. Ebenso geben die vielerwähnten Tröpfchen in den Leukoplasten der Epidermis von *Agave americana* und des Stengelparenchyms von *Equisetum arvense* Phytosterinsphärite. Kohl faßt diese Einschlüsse als Fettbildner auf. Ihre fettartige Natur wurde übrigens schon lange vorher von A. Meyer³⁾ festgestellt. Haben die Phytosterinkristalle Farbstoffe gespeichert, so kann man nach Molisch⁴⁾ die Präparate einige Tage in Bromwasser legen und dann erst mit Schwefelsäure oder mit Schwefelsäure-Chloroform prüfen.

Zu den phytosterinartigen Alkoholen gehört das Alkornin, das bis zu 1,25% in der Rinde von *Bowdichia virgilioides*, der *Alcornoco-*

¹⁾ H. Scherer, Über Phytosterine und einige fette Öle, Dissertation Straßburg, 1909, S. 11.

²⁾ F. G. Kohl, Untersuchungen über das Carotin und seine physiol. Bedeutung in der Pflanze, Leipzig 1902.

³⁾ A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, Leipzig 1883.

⁴⁾ H. Molisch, Ber. deutsch. bot. Ges., 1896, XIV, S. 28.

rinde des Handels, vorkommt. Es läßt sich mit Jodjodkaliumlösung nachweisen, der einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zugefügt sind. Man entfernt zunächst die Stärke durch mehrtägige Mazeration mit verdünnter Natronlauge und wiederholtes Auswaschen mit Wasser; nachfolgender Zusatz von Jodjodkalium-Schwefelsäure zeigt die dunkelblauen Zellulosemembranen und in den Zellen durch eine homogene Violettfärbung den Sitz des Alkornins. Alkornin findet sich im inneren Parenchym der Mittelrinde, im Bast und besonders in den Markstrahlen (Hartwich und Dünneberger)¹⁾.

Leucin.

v. Gorup Besanez fand Leucin (α -Amidoisocaprinsäure) in Vicia-Keimlingen auf, in denen es sich, ebenso wie in *Lupinus luteus*, in jungen Pflänzchen in großer Menge anhäufen kann. Im allgemeinen findet es sich aber nicht in großen Quantitäten. Es wird angegeben für die Knospen der Roßkastanie (Schulze), für Kartoffeln (Schulze, Barbieri), Zuckerrüben (Lippmann), Phaseolus, Cucurbita (Schulze), *Secale cornutum* (Burgermeister und Buchheim), Hefe (Schützenberger). Im Tierreich ist es in zahlreichen Insekten gefunden worden, tritt auch in Leber, Milz, Pankreasdrüse u. a. auf. Bei der Hydrolyse der Eiweißkörper entsteht Leucin in größerer Menge. Reines Leucin schmilzt bei 293–295° (E. Fischer), unreines Präparat bei 170°. Leucin ist unlöslich in Äther und Chloroform, sehr schwer löslich in Alkohol, leicht löslich in Wasser und bildet farblose, glänzende Blättchen. Es ist ein wichtiger Baustoff und pflegt Asparagin zu begleiten.

Um Leucin mikroskopisch zur Anschauung zu bringen, was aber nicht immer gut gelingt, benutzt man frische Dahliaknollen oder junge Pflänzchen von *Lupinus luteus*, *Vicia* u. a. Die nicht zu dünnen Präparate kommen in einen Tropfen Alkohol; beim Verdunsten scheidet sich (neben Asparagin und anderen Amidokörpern) Leucin in Form sehr kleiner Schuppen aus. Von den anderen Ausscheidungen kann man nun Leucin durch Sublimation trennen (Borodin)²⁾. Man läßt das Alkoholpräparat einige Zeit offen liegen, um es ganz eintrocknen zu lassen, bedeckt es dann mit dem Deckgläschen und erhitzt bis auf etwa 170°. Hierbei sublimiert Leucin meist ohne Zersetzung. Die Leucinkristalle haften nun am Deckgläschen und können mit diesem entfernt werden, Asparagin findet sich nach dem Erhitzen im Präparate in schaumig-ölgigen Tropfen, Kaliumnitrat scheidet sich beim Er-

¹⁾ C. Hartwich und E. Dünneberger, Über eine als Jaborandi in d. Handel gekomm. Alcornocorinde usw., Arch. d. Pharm., 1900, CCXXXVIII, S. 341, Dissert., Zürich 1900, S. 53.

²⁾ Borodin, Über Sphärokristalle aus *Paspalum elegans* u. über die mikrochem. Nachweisung von Leucin, Bot. Zentralbl., 1884, XVII, S. 102.

kalten wieder kristallinisch aus. Da aber bei dieser Vorschrift Borodins das Deckglas des Trockenpräparates selbst bei vorsichtigem Erhitzen oft abgeschleudert wird (Tunmann), so ist es vorteilhafter, in der üblichen Weise auf der Asbestplatte bei möglichst niedrigem Sublimationsraum zu sublimieren.

Im Präparate selbst kann Leucin mit Borodins Methode identifiziert werden, die Leucinkriställchen wachsen in einer konzentrierten wässerigen Leucinlösung, alle anderen hier in Betracht kommenden Amidokörper und Kaliumnitratkristalle werden gelöst. Läßt man frische Präparate längere Zeit unter Deckglas in Glyzerin liegen, dann scheidet sich Leucin in ganz charakteristischen, herzförmigen Lamellen aus, die ebenfalls mit Leucinlösung identifiziert werden können, zuweilen Sphärokristalle bilden und sich in reichlicher Menge in Keimlingen finden (*Lupinus albus*). Nach Belzung¹⁾ gelangt es auch in den Interzellularräumen zur Kristallisation.

Asparagin (Glutamin, Arginin, Histidin).

Asparagin, das Amid der Amidobernsteinsäure, von Delaville 1802 in *Asparagus* aufgefunden, bildet sich vielfach im Stoffwechselprozeß. Reichlich findet es sich in Papilionaceen-Keimlingen, besonders in etiolierten (25% der Trockensubstanz), aus denen man es auch darstellt (*Lupinus*, *Vicia*). Man gewinnt es aus dem wässerigen eingeeengten Pflanzenextrakte, indem man die Eiweißstoffe durch Kochen abscheidet und die sich ausscheidenden Asparaginkristalle durch Umkristallisieren reinigt. Asparagin findet sich in Wurzeln (*Glycyrrhiza* 2–4%, *Althaea* 2%, *Symphytum officinale* 1–3%, *Beta*, *Dahlia*knollen u. a.), häufig in verdunkelten Zweigen und Knospen u. a. Pfeffer zeigte, daß bei der Verdunkelung zugleich mit der Anhäufung von Asparagin eine Abnahme an Zucker stattfindet²⁾. Asparagin ist ein wichtiger Baustoff, dient zum Transport stickstoffhaltiger Substanzen, zur Regeneration des Plasma; in den Keimpflanzen fällt die Kurve des Eiweißzerfalls mit der der Asparaginbildung zusammen (Prianischnikow). Es spielt bei der Eiweißsynthese eine wichtige Rolle, doch liefert es hierzu nicht das Hauptmaterial (Zalewski³⁾). Wahrscheinlich beruht die

¹⁾ E. Belzung, Sur divers principes issus de la germination et leur cristallisation intracellulaire, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 49.

²⁾ Tichomirow hat bei den zahlreichen auf Zucker untersuchten Pflanzen (s. Glykosen) nur bei *Lemna* und *Atropa* keinen Zucker gefunden, bringt hierfür jedoch keine Erklärung; diese erscheint nach obigem naheliegend. *Atropa* führt Asparagin, womit weiter in Einklang steht, daß sie typische Schattenpflanze ist.

³⁾ Vergl. Zalewski, Ber. bot. Ges., 1898, XVI, S. 146. — Prianischnikow, Ber. bot. Ges., 1899, XVII, S. 151. — Pfeffer, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 533. — Löw, Chem. Ztg., 1896, XX, Nr. XVI. — Die zahlreichen Arbeiten von E. Schulze u. s. Schülern, in Landwirtsch. Versuchsst., Ber. bot. Ges., 1907, XXV, S. 213 u. a.

Asparaginbildung auf einen enzymatischen Vorgang. Nach E. Schulze verwendet die Pflanze zur Asparaginbildung Bernsteinsäure. Nach Prianischnikow¹⁾ entsteht „Asparagin hauptsächlich oder ausschließlich in den wachsenden Teilen auf sekundäre Weise aus den gewöhnlichen Eiweißzerfallprodukten“.

Da Asparagin in den lebenden Zellen in gelöster Form auftritt und sehr leicht in Wasser, dagegen kaum in Alkohol löslich ist, so benutzt man in erster Linie Alkohol zum mikrochemischen Nachweis. Vorteilhaft bedient man sich frischen Materials und benutzt zu Demonstrationszwecken Spargel oder 2–3 cm dicke Dahlienknollen, auch etiolierte Keimlinge und Althaeawurzeln. Die etwa 0,3–0,5 mm starken Präparate kommen auf dem Objektträger in absoluten Alkohol und werden mit dem Deckglas bedeckt. Nach dem völligen Verdunsten des Alkohols hat sich Asparagin in Täfelchen ausgeschieden. Über-

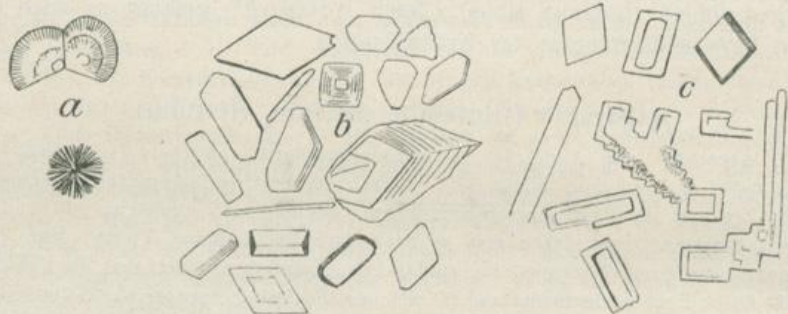


Fig. 47. Asparaginkristalle a) aus dem Handelpulver deutscher Althaeawurzel, b) aus *Atropa belladonna* (Blatt) mit Alkohol gefällt; c) Salpeterkristalle aus *Nicotiana glauca* (Stengel) mit Alkohol gefällt (Tunmann).

wiegend bilden sich rhombische Täfelchen mit stumpfen Winkeln und abgestutzten Ecken. Zum Teil wird die Kristallform von der Art der Verdunstung und der Menge des vorhandenen Asparagins beeinflusst. Bei sehr langsamem Verdunsten und bei Gegenwart von reichlichen Mengen resultieren auch Nadeln, bei sehr schnellem Verdunsten federartige Skelette. Die Kristalle sind unlöslich in Chloroform, Benzol, ätherischen Ölen, lösen sich leicht in verdünnten Säuren, Ammoniak, Chloralhydrat und Kalilauge. Die Angabe von Walliczek²⁾, daß Asparagin in Ammoniak und Kalilauge unlöslich sein soll, trifft nach meinen Befunden weder für die Handelsware noch für die mit Alkohol aus Pflanzen gefällten Asparaginkristalle zu (Fig. 47).

¹⁾ D. Prianischnikow, Zur Frage der Asparaginbildung, Ber. bot. Ges., 1904, XXII, S. 21.

²⁾ H. Walliczek, Studien über den Membranschleim vegetat. Organe, Dissert. Bern, 1893, S. 50, Jahrb. f. wiss. Bot., 1893, XXV, S. 209.

Die sich gleichzeitig ausscheidenden Kaliumnitratkristalle stellen ähnliche Täfelchen dar, die aber nicht so regelmäßig auskristallisieren und nur rechte Winkel zeigen¹⁾ (Fig. 47 c). Zur weiteren Unterscheidung von Kaliumnitratausscheidungen stehen 2 Methoden zur Hand. Kaliumnitratkristalle geben eine Salpetersäurereaktion, lösen sich somit mit tiefblauer Farbe in Diphenylaminschwefelsäure²⁾ oder rot in Brucinschwefelsäure. Um aber einen sicheren Schluß fällen zu können, muß der Zusatz der Reagentien sehr vorsichtig geschehen, so daß man die Reaktion unter dem Mikroskop genau verfolgen kann. Andererseits läßt sich Borodins Verfahren³⁾ zur Differentialdiagnose verwenden. Es müssen bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Asparaginlösung die Asparaginkristalle an Größe zunehmen, die Kaliumnitratkristalle sowie alle anderen wasserlöslichen Substanzen im Wasser des Reagens aber gelöst werden. Andere in Wasser schwer lösliche Ausscheidungen, wie Tyrosin, bleiben hierbei erhalten, wachsen aber nicht. Tyrosin (s. d.) wird überdies durch Millons Reagens rot. Eine gesättigte Kaliumnitratlösung kann man zur Borodinschen Methode wegen der großen Löslichkeit des Kaliumnitrats nicht anwenden. Doch finde ich, daß sich die Salpeterkristalle weit leichter in Wasser lösen als Asparagin. Bei kräftigem Anhauchen und sofortiger mikroskopischer Kontrolle sind meist die Salpeterkristalle verschwunden, während die Asparaginkristalle erhalten bleiben; erstere kann man nach wenigen Augenblicken wieder anschießen sehen. — Schließlich lassen sich die Erscheinungen, die beim Erhitzen der Kristalle auftreten, zur Unterscheidung heranziehen. Erwärmt man die aus Alkohol gewonnenen und am Deckglas haftenden Asparaginkristalle bis auf etwa 100°, dann lösen sie sich in ihrem Kristallwasser und bilden öltartige Tröpfchen, die wasserlöslich sind; beim Erhitzen der Kristalle (auf 200°) entstehen braune, schaumige, in Wasser unlösliche Massen. Kaliumnitrat wird beim Erwärmen bis auf 100° nicht zersetzt, die Nitratkristalle sind nach dem Abkühlen wieder sichtbar.

Beim Einlegen größerer lebender Pflanzenteile (junge Süßholzwurzeln) in Alkohol scheidet sich Asparagin auch in Form kleiner dendritischer Kristalle oder feiner Nadelchen aus. Letztere gruppieren sich bisweilen um einen Punkt und bilden sphärokristallinische Gebilde. Derartige Ausscheidungen finden wir, wenn wir die aus Alkoholmaterial

¹⁾ A. Zimmermann, Mikrotechnik, 1892, S. 80, Anm.

²⁾ C. O. Müller, Ein Beitr. z. Kenntnis d. Eiweißbild. in d. Pflanzen, Dissert. Leipzig, 1886, auch Serno, Landwirtsch. Jahrb., 1889, S. 877.

³⁾ Borodin, Üb. d. phys. Rolle u. d. Verbreit. d. Asparagins im Pflanzenreiche, Bot. Ztg., 1878, XXXVI, S. 801.

hergestellten Schnitte direkt in Alkohol beobachten¹⁾, Sphärokristalle trifft man häufig im Handelspulver der deutschen *Althaea* an (Fig. 47a). Es erscheint mir aber fraglich, ob in ihnen das Asparagin in reiner Form vorliegt, denn diese Bildungen reagieren zwar positiv nach Borodin, lösen sich aber schwer in verdünnten Alkalien. Keineswegs gelangen auf diese Weise die gesamten Asparaginnmengen zur Kristallisation. Diese kann nämlich durch Polysaccharide (Schleim, Gummi, Inulin) mehr oder weniger gehindert werden, bisweilen ganz unterbleiben. Man bringt in solchen Fällen die Kristallisation derart zustande, daß man 1 cm starke Pflanzenteile in Alkohol legt. Schon in wenigen Tagen pflegen sich auf den Schnittflächen bis 1 mm große Kristalle (rhombische Säulen) auszuschcheiden. Die mit Kristallen bedeckte Schnittfläche des Pflanzenstückes wird zum mikroskopischen Präparate benutzt. Die Angabe Leitgeb's²⁾, daß auch Glyzerin die Kristallisation hindere, gilt für konzentriertes Glyzerin wenigstens nicht. Denn bei lebend in konzentriertes Glyzerin eingelegten dicken Präparaten der Süßholzwurzel fand ich oft Asparaginkristalle (Sphärokristalle) und Belzung³⁾ fand beim Einlegen in reines Glyzerin in den Interzellularräumen rhombische und rechteckige (?) Tafeln von Asparagin. Dann ist das Asparagin nicht mehr am Orte seiner Entstehung.

Zur Auffindung geringer Asparaginausscheidungen bedient man sich des polarisierten Lichtes. Die Kristalle treten dann farbig leuchtend deutlich hervor. Salpeter leuchtet im allgemeinen nicht so lebhaft, nur die größeren Kristalle zeigen blaue und rote Polarisationsfarben.

Als Hilfsreaktion beim Nachweis aliphatischer Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure u. a.) dient Chinon (s. Eiweiß). Bei *Asparagus* wird vornehmlich das Leptom gerötet; in erwachsenen Teilen ist die Rötung in den Siebröhren am stärksten.

Über die anderen bei dem Zerfall und dem Aufbau von Eiweiß beteiligten Amidokörper liegen genügende mikrochemische Untersuchungen nicht vor. Die Chemie dieser Körper (Glutamin, Tyrosin [s. Eiweiß], Arginin, Lysin, Histidin u. a.) wurde in erster Linie von der Schule E. Schulzes geklärt. In etiolierten Keimpflanzen finden sich Arginin, Histidin, Lysin, Cholin (S. 179), Trigonellin (s. Alkaloide), Lupanin. Im Stoffwechsel werden wieder verbraucht: Arginin, Histidin, Lysin, Cholin; nicht verbraucht werden Trigonellin, Lupanin,

¹⁾ Dahmen, Über den Funiculus der Samen, Dissertat. Erlangen, 1891, S. 12.

²⁾ H. Leitgeb, D. Gehalt d. Dahliaknollen an Asparagin u. Tyrosin, Mitt. bot. Inst., Graz 1888, Heft 2, S. 215.

³⁾ E. Belzung, Sur divers principes d. l. germination et leur cristallisation intracellulaire, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 49.

Betain. Studienobjekte sind etioliierte Keimpflanzen (*Lupinus*, *Cucurbita pepo*, *Helianthus*, *Vicia* u. a.). Glutamin wird man relativ leicht beim Asparaginnachweis mittels Alkohol erhalten (Stachysknollen, *Vicia*- und *Cucurbita*-Keimlinge), wenn man die Alkoholpräparate einige Tage im Exsikkator austrocknet. Die Glutaminadeln lösen sich sehr leicht in Wasser (beim Anhauchen), sind aber in absolutem Alkohol unlöslich. Mit Pikrolonsäure erhält man fast stets im Gewebe etiolierter Keimlinge tiefgelbe, kristallinische Niederschläge, doch müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob bei diesen sich Arginin, Histidin oder noch andere Amidokörper beteiligen. Nach Brigl¹⁾ geben Arginin und Histidin mit Pikrolonsäure ein gelbes Monosalz und eine orangefarbene Diverbindung.

Cholin und Betain.

Cholin (Trimethyl-oxyäthylammoniumhydroxyd) tritt präformiert in den Zellen auf, ist ferner ein Spaltungsprodukt der Lecithine und wird im Gegensatz zum Betain im Stoffwechsel wieder verbraucht²⁾. Betain (Trimethylglycocoll) entsteht bei der Oxydation des Cholins und begleitet daher meist das Cholin. Cholin ist gefunden worden in Pilzen (*Secale cornutum*, *Helvella esculenta*, *Boletus luridus*), in etioliierten Keimpflanzen (*Lupinus*, *Vicia*, *Pisum* u. a.) und in *Trigonella*, *Gossypium*, *Cannabis*, *Vicia*, *Fagus*, *Strophanthus*, *Areca catechu*, *Arachis* u. a. (Samen), *Atropa*, *Ipecacuanha*, *Althaea*, *Acorus calamus*, *Beta vulgaris* (Wurzeln), *Artemisia cina* (Blüten), Solanaceen (*Atropa*, *Hyoscyamus*), *Helianthus annuus* u. a.

Mikrochemische Erfahrungen über den Nachweis von Betain und Cholin fehlen. Bei orientierenden Versuchen, die im folgenden angeführt sind, erwies sich *Helianthus annuus* als geeignetes Versuchsobjekt. Als Reagentien kommen in Betracht: Brom-, Chlor- und Joddämpfe, Platin- und Goldchlorid, weniger geeignet ist Sublimat, guten Erfolg gibt Jodjodkalium in angesäuerten Schnitten. Setzt man Schnitte (Stengel, Blattstiel, Blattnerve) den Dämpfen von konz. Salzsäure aus, dann gelangen Kristallkomplexe zur Abscheidung, die auf einzelne Zellgruppen beschränkt sind, teils sphäritischen Aufbau zeigen, teils aus aufeinandergelegten Kristallplatten bestehen. Sie lösen sich in Wasser und zurückbleiben farblose ölige Tropfen und tiefbraune Massen, die sich zu schmierigen Klumpen zusammenballen. Kalzium fehlt oft. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich um Ammoniumchlorid und um

¹⁾ Pikrolonsäure wurde von Kossel, Weiß u. a. zur quantitativen Bestimmung von Arginin und Histidin benutzt (Brigl, Ztschr. f. phys. Chem., 1910, LXIV, S. 337 u.; E. Schulze u. Winterstein, Ztschr. f. phys. Chem., 1910, LXV, S. 431).

²⁾ Zahlreiche Arbeiten von E. Schulze und Trier (Zeitschr. f. phys. Chem. u. Landw. Jahrb.).

organische Substanz handelt. Den übrigen Reaktionen zufolge, die übrigens nicht gut ausfielen, scheint Cholin (und Betain?) im Plasma aufzutreten (besonders an den Trichomen zu sehen) und zwar in den Palisaden, obere Epidermis (?), Leitparenchym, in subepidermalen Zellen und in Trichomen. Starke Reaktionen zeigen die Zellen, welche die Blattbündel an ihrer Oberseite begrenzen. Die Cholin führenden Zellen zeichnen sich zuweilen durch ihren Gehalt an phosphorsaurem Kalk aus, so daß es den Anschein gewinnt, als ob Cholin und Kalziumphosphat in loser Bindung auftreten. Die Cholinzellen (auch die besprochenen Kristalle) gaben starke Reaktion mit Nesslerschem Reagens. *Helianthus annuus* bietet für den Mikrochemiker ein in vieler Hinsicht vorzügliches Studienobjekt. Bei anderen Objekten (*Secale cornutum*) scheinen andere Verhältnisse vorzuliegen und das Alter der Lagerung scheint von Einfluß zu sein, daher ist lebendes Material zu benutzen.

In neuerer Zeit hat Staněk¹⁾ die Lokalisation des Betains studiert. Diese Arbeit kam erst bei der Korrektur durch ein Referat von Matouschek zu meiner Kenntnis. Mikrochemische Methoden sind in dem Referate nicht erwähnt. Im Samen von Beta und *Amaranthus* ist Betain nur in der Samenschale und in größerer Menge im Frühjahr in jungen Blättern zugegen. Betain soll kein Reservestoff sein, aber „eine wichtige Aufgabe im Kreislaufe des Stickstoffes“ spielen.

Allantoin.

Allantoin (ein Derivat der Nukleinbasen,?) entsteht bei der Oxydation von Harnsäure und bildet Prismen, die sich unter Deckglas schwer in kaltem Wasser, nicht in kaltem Alkohol lösen. Es ist aufgefunden worden in Sprossen und Trieben von *Acer* und *Platanus* (0,3—1,0%), in der Rinde von *Aesculus hippocastanum*, in Weizenkeimen (0,5%), in *Cordia excelsa* (Blatt 0,26%, Rinde 0,78%), *Symphytum officinale* (0,6—0,8%). — Im Tierreich findet es sich im Harn (bei Neugeborenen und bei krankhaften Zuständen).

Mit der Mikrochemie hat sich in neuerer Zeit Harvey-Gibson²⁾ beschäftigt. Allantoin wird im Rhizom von *Symphytum officinale* mit Quecksilberniträt nachgewiesen (weißer Niederschlag) und ist im Parenchym der Markstrahlen und der Rinde lokalisiert. Bei der Droge tritt die Reaktion nicht genügend scharf ein, so daß eine weitere Untersuchung erwünscht ist, die auch die Natur der Tröpfchen von „fettähnlichem“ Aussehen aufzuklären hätte. Ferner scheinen kristallinische Ausscheidungen (nicht polarisierende Stäbchen) vorzukommen. Das Sublimat der Droge besteht aus Tröpfchen, die sich leicht in Wasser und in Alkohol lösen; aus der alkoholischen Lösung

¹⁾ Staněk, Über die Lokalisation des Betains in der Pflanze, Sitzber. böhm. Ges., Prag 1912, S. 1 (Tschechisch), Bot. Centralbl. 1912, CXX, S. 363.

²⁾ R. J. Harvey-Gibson, Pharm. Journ., 1912, LXXXVIII, S. 91.

scheidet sich ein feinkristallinischer Niederschlag ab. Salpetersäure färbt gelb. Wahrscheinlich sind im Sublimat Spaltungsprodukte von Allantoin zugegen.

Hexosen und Saccharosen.

Von den seit den klassischen Arbeiten Emil Fischers synthetisch hergestellten Zuckerarten kommen nur relativ wenige in den Pflanzen vor. Die Zuckerarten sind in der Zelle teils in freiem Zustande teils in glykosidischer Bindung enthalten. In größerer Menge treten frei die Hexosen auf, sowohl der Traubenzucker (Glykose im engeren Sinne, Dextrose) als auch der Fruchtzucker (Fructose, Laevulose). Hexosen nehmen im Leben der Zellen neben den Eiweißstoffen den ersten Platz ein. Sie sind die ersten greifbaren Assimilationsprodukte, fehlen wohl keiner pflanzlichen Zelle. Als Hexosen wandern die Kohlehydrate. In größerer Menge finden wir sie in Wurzeln und Früchten, während sie in den reifen Samen gegenüber den anderen Reservestoffen stark zurücktreten und erst wieder bei der Mobilmachung der Reservestoffe gebildet werden. In den Früchten dienen sie als Anlockungsmittel für Vögel zum Verschleppen der Samen, wodurch gleichzeitig die Samen (durch Passieren des Darmkanals) leichter zum Keimen kommen. Der Nektar dient den Insekten zur Nahrung (Pollenübertragung).

Der Traubenzucker gehört zu den Aldohexosen (Aldosen). Zu dieser Gruppe zählt d-Mannose und d-Galaktose. d-Mannose, das Aldehyd des Mannits, aus den Orangenschalen hergestellt, wurde nur in kleinen Quantitäten gefunden. Derivate der Mannose sind die in der Reservezellulose vorkommenden Mannane. Galaktose ist mit Sicherheit frei noch nicht gefunden. Die Derivate (Galaktane) sind ebenfalls membranbildende Substanzen. Der Fruchtzucker zählt zu den Ketohexosen (Ketosen), wohin auch die Sorbose gehört, die neben Sorbit in kleinen Mengen in den Früchten von *Sorbus aucuparia* angetroffen wurde.

Rohrzucker (Saccharose im engeren Sinne, eine Hexobiose, ein Disaccharid), der durch Säuren und Fermente in seine beiden Spaltlinge, Dextrose und Laevulose, zerfällt, ist ebenfalls in allen chlorophyllhaltigen Organen gefunden worden, muß jedoch zur Nutzbarmachung erst in seine Komponenten übergeführt werden. Bei der Keimung der Dattel bildet er die erste Kohlehydrat-Nahrung des Embryo und erst später werden die in den Membranen enthaltenen Galakto-Mannane in ausnützbarer Zucker (Mannose und Galaktose) übergeführt. Bei seiner Wanderung zum Sproß geht er in (transitorische) Stärke über. Ein gutes Objekt, um die Rohrzuckerbildung aus Traubenzucker zu verfolgen, ist nach J. Grüss (Ber. bot. Ges., 1898, XVI, S. 17) das Skutellum monokotyler Samen. Wo Rohrzucker in größerer Menge auftritt, kommt ihm der Charakter eines Reservestoffes zu. Als solcher tritt er in vielen Wurzeln (Umbelliferen) und in Stengeln (Palmen, *Saccharum*) auf. Durch Kultur und Zuchtwahl hat man den Rohrzuckergehalt von *Beta vulgaris* von 8 bis auf 16% erhöht. Der Saft der Stengel von *Saccharum officinarum* führt bis zu 20%, der von *Acer saccharum* noch mehr Rohrzucker und im Stengel von *Zea mays* läßt er sich durch Entfernen der unreifen Kolben bis auf 12–14% der frischen Stengel anreichern. In

den Nektarien vieler Blüten ist ebenfalls Rohrzucker zugegen. In einigen Blüten finden sich sogar größere Mengen, so enthalten die Blüten von *Sesbania grandiflora* Poir. nach Boorsma 8% der Trockensubstanz an Rohrzucker (neben 44,3% Invertzucker; Teysmannia 1910).

Zu den Disacchariden zählen noch die Maltose, die nur in kleinen Mengen in freiem Zustande vorkommt (Sojabohnen) und die Mykose (Trehalose) der Pilze (*Secale cornutum*).

Der Gang der Zuckerbildung und -Umwandlung ist beim Zuckerrohr sehr regelmäßig. Organe, die kein Wachstum mehr zeigen, speichern Saccharose, im Wachstum begriffene Gewebe führen Glykose und Fruktose (Went, Chem.-phys. Unters. üb. d. Zuckerrohr, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 325).

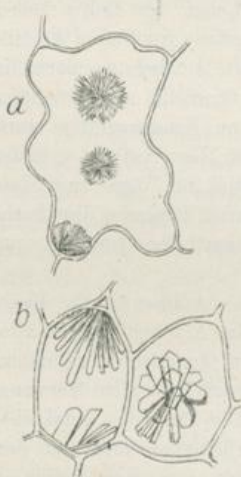


Fig. 48. Zuckerkristalle in Glycerinpräparaten, a) *Urtica maritima*, b) *Phoenix dactylifera* (Tunmann).

Hexosen und Saccharosen sind in den lebenden Zellen stets in Lösung, scheiden sich auch beim Trocknen der Pflanzen nur relativ selten in kristallinischen Bildungen aus, da unreine Zucker nur schwer kristallisieren. Im Herbarmaterial, in Drogen und im Alkoholmaterial findet man nur selten Zuckerkristalle, die, da sie wasserlöslich sind (Rohrzucker löst sich auch in Alkohol), in Glycerin oder Ölpräparaten betrachtet werden (Fig. 48). Bekannt sind Zuckerausscheidungen der Feige (dünne Blättchen), Dattel, des Johanniskrautes, der Rosinen u. a. Nadelförmige Zuckerkristalle finden wir in *Bulbus Scillae*, den Blättern von *Convallaria* und zuweilen bei frisch in Alkohol eingelegten Samen von *Colchicum autumnale*. Besser ausgebildete Kristalle erhält man bei frisch in Glycerin eingelegten Präparaten (Fig. 48).

Der mikrochemische Nachweis der Hexosen (Traubenzucker oder Dextrose, und Fruchtzucker oder Laevulose) und Saccharosen (Rohrzucker und Maltose) datiert von Sachs¹⁾ her, welcher die von Trommer entdeckte Methode in die mikroskopische Technik einführte; diese benutzt bekanntlich die Fähigkeit der Hexosen, alkalische Metallsalzlösungen unter Abscheidung der Metalle in der Hitze zu reduzieren. Nicht zu dünne Schnitte, die wenigstens zwei unversehrte Zelllagen enthalten und vorher nicht gewässert haben dürfen (Drogen sind trocken zu schneiden), gelangen auf 1 bis 5 Minuten in eine konzentrierte Kupfersulfatlösung, werden dann rasch mit destilliertem Wasser oberflächlich abgespült und auf einen bereit gehaltenen Objektträger in 1 bis 2 Tropfen siedende Kalilauge (Kaliumhydroxyd und Wasser zu gleichen Teilen)

¹⁾ J. Sachs, Über einige neue mikrosk.-chem. Reaktionsmethoden, Sitzber. d. Münchener Akad., 1859, S. 8; Flora, 1862, S. 289 und Jahrb. f. wiss. Bot., 1864, III, S. 187.

übertragen. Die Dauer der Einwirkung der Kupferlösung richtet sich nach der Dicke der Schnitte und nach der Beschaffenheit der vorhandenen Gewebe (meist genügen 2 Minuten). Zellen, die Dextrose oder Laevulose führen, zeigen bald nach dem Eintragen in die heiße Lauge einen orange- oder rotgelben, feinkörnigen Niederschlag (Gerinnung) von reduziertem Kupferoxydul. Die rohrzuckerhaltigen Zellen werden zunächst nur durch blaue Färbungen angezeigt. Kocht man nun die Präparate einige Zeit und führt man so den Rohrzucker in Invertzucker (Dextrose und Laevulose) über, dann erscheint von neuem ein mennigeroter Niederschlag von Kupferoxydul.

Wie nun in der Chemie Trommers Reagens von Fehling verbessert wurde und jetzt vorwiegend die Fehlingsche Lösung benutzt wird, so ging man auch in der Mikrochemie zum Gebrauch der Fehlingschen Lösung über bei der die Lauge mit Seignettesalz (saurem weinsaurem Natrium) versetzt ist. Da die fertige Lösung jedoch nur kurze Zeit unzersetzt haltbar ist, so hält man sich die einzelnen Bestandteile derselben in getrennten Lösungen vorrätig und mischt letztere erst beim Gebrauch. Nach Dragendorff¹⁾ führt man drei getrennte Lösungen, von denen in je 1 Liter die erste 35 g Kupfersulfat, die zweite 173 g Seignettesalz, die dritte 120 g Ätznatron enthält. Nach Schimpers²⁾ Vorgange bringt man auf den Objektträger einen großen Tropfen Wasser und je einen kleinen Tropfen der eben genannten Lösungen, mischt die Flüssigkeit mit einem Glasstabe (an Präpariernadeln würde sich Kupfer abscheiden), trägt in die derart frisch bereitete Fehlingsche Lösung die Schnitte ein, bedeckt mit dem Deckgläschen und erhitzt bis zur Blasenbildung. Einfacher hält man sich nach Allihn³⁾ nur zwei Lösungen vorrätig. Lösung 1 besteht aus 34,6 g Kupfersulfat in 500 ccm destilliertem Wasser, Lösung 2 enthält in 500 ccm Wasser 173 g Seignettesalz und 125 g Kaliumhydroxyd. Diese Lösungen halten sich bei gutem Verschluss und wenn man nicht mit unsauberen Glasstäben hineinkommt, selbst bei häufigem Gebrauch mehrere Jahre. Zur Untersuchung werden gleiche Teile von jeder Lösung auf dem Objektträger vermischt. Übrigens läßt sich die Brauchbarkeit sowohl der nach Dragendorff als nach Allihn erhaltenen Lösungen sehr leicht feststellen. Man hat nur nötig, die Lösung für sich zu erhitzen, wobei sie sich nicht reduzieren darf.

Die Reaktionen mit Fehling haben nun verschiedene Nachteile. Zu diesen zählt der Umstand, daß der durch Hexosen bewirkte Niederschlag von Kupferoxydul nicht streng auf die zuckerhaltigen Zellen lokalisiert ist, sondern als amorphe flockige Masse, besonders bei etwas längerem Erhitzen, sich im ganzen Präparate verteilt. Um diesen

¹⁾ Dragendorff, Die qualitative und quantitative Analyse von Pflanzenteilen, 1882, S. 70.

²⁾ A. F. W. Schimper, Anl. z. mikr. Unt. d. veget. Nahr.- u. Genußm., Jena 1900 und Strasburger, Bot. Prakt., II. Aufl., 1887, S. 73.

³⁾ Allihn, Journ. prakt. Chem., XXII, S. 55.

Nachteil zu beheben und um die Bildung störenden Kupferoxyds zu umgehen, schlug A. Meyer¹⁾ nachstehende Methode vor: „Man stellt 2 bis 4 Zelllagen dicke Schnitte der zu untersuchenden Pflanzenteile her, legt sie kurze Zeit in eine gesättigte Lösung von Kupfersulfat, schwenkt sie schnell einmal in Wasser ab und bringt sie sofort in eine siedende Lösung von 10 g Seignettesalz und 10 g Ätzkali in 10 g Wasser. Nach einigen Sekunden ist in allen Zellen, welche reduzierenden Zucker enthalten, ein meist kristallinischer Niederschlag von Kupferoxydul entstanden, während die anderen Zellen vollkommen farblos bleiben. Dieses Verfahren liefert sehr brauchbare Resultate. Für zartere Freihandschnitte genügt ein Aufenthalt von 2 bis 3 Minuten in der Kupfersulfatlösung. Auch empfiehlt es sich, die Schnitte nach dem Abspülen mit Wasser direkt in den auf dem Objektträger befindlichen Tropfen Alkalilösung zu bringen, das Deckglas aufzulegen und nun bis zur Blasenbildung zu erhitzen.

Ähnliche Erfolge liefert die Methode von A. Fischer²⁾, der Glykosen in Gefäßen nachwies, indem er median gespaltene Holz- oder Stengelstücke auf 5 Minuten in konzentrierte wässrige Kupfersulfatlösung einlegte, mit Wasser abspülte und sie alsdann in einer siedenden Lösung von Seignettesalz-Natronlauge (86,5 g Seignettesalz, 60 g Ätznatron in 1000 g Wasser) 2 bis 5 Minuten kochen ließ. Aus den Stücken werden die Präparate hergestellt und am besten in Glyzerin beobachtet. Zu Versuchen kann getrocknetes Holz dienen sowie jedes in größeren Stücken in Alkohol eingelegte Material (hierbei wird Rohrzucker herausgelöst), von dem vor der Reaktion die Schnittflächen entfernt werden müssen. Der Niederschlag bleibt auf die zuckerführenden Elemente gut lokalisiert.

Elegante Resultate gibt die Reaktion von Flückiger³⁾ mit festem Kupfertartarat, die sich sonderbarerweise in botanischen Kreisen nicht Eingang verschafft hat. Das Kupfertartarat kann in sehr einfacher Weise selbst hergestellt werden. 30 g Kupfersulfat werden in 300 g heißem Wasser und 70 g Seignettesalz in 200 g heißem Wasser gelöst. Beide Lösungen werden gemischt, der Niederschlag wird gesammelt, getrocknet, und, nachdem er einige Tage im Exsikkator gelegen, in einem kleinen braunen Gefäße aufbewahrt. Das Kupfertartarat ist haltbar,

¹⁾ A. Meyer, Mikrochemische Reaktion zum Nachweis der reduzierenden Zuckerarten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 332.

²⁾ A. Fischer, Beiträge zur Physiologie der Holzgewächse, Jahrb. f. wiss. Bot., 1890. XXII, S. 73.

³⁾ F. A. Flückiger, Pharmaz. Chem., Pharmakognosie u. auch in Flückiger u. Tschirch, Grundlagen der Pharmakognosie, 1885, S. 237.

wenigstens besitzt ein selbst vorbereitetes über 3 Jahr altes Präparat noch seine volle Wirksamkeit. Zur Reaktion wird eine kleine Menge auf dem Objektträger in einem Tropfen 15–20 % Natronlauge gelöst und nach erfolgter Lösung der Schnitt eingetragen und das Präparat mit dem Deckglas bedeckt. Statt der Natronlauge kann man auch ein Körnchen Ätznatron auf dem Objektträger in Wasser auflösen und erst in dieser frisch bereiteten Lauge etwas Kupfertartarat lösen. Das ist aber umständlicher und einen Vorteil habe ich dabei nicht wahrgenommen. Die Vorteile der Flückigerschen Methode sind erhebliche. Fruchtzucker (Fruktose) scheidet sofort (ohne Erwärmung!) rotgelbes Kupferoxydul ab, der Niederschlag ist gut lokalisiert. Ein bei nachfolgendem gelindem Erwärmen neu entstehender Niederschlag zeigt Traubenzucker an, bei längerem Erwärmen auch Dextrin. Hingegen entsteht kein Niederschlag, falls nur Rohrzucker oder Mannit zugegen ist.

Gegenüber dem Flückigerschen Verfahren bietet die Zuckerreaktion mit angesäuertem Kupferazetat von Barfoed¹⁾ keine Vorteile. Sie teilt mit der Reaktion von Sachs den Nachteil, daß der Niederschlag nicht auf die zuckerhaltigen Zellen beschränkt bleibt und zeigt keine Saccharose (Rohrzucker) an. 13,3 g neutrales kristallisiertes Kupferazetat wird in 200 g Wasser gelöst und zu 200 ccm dieser Lösung 5 ccm 38 % Essigsäure (1,0502 spez. Gew.) zugefügt. Die Reaktion wird in kleinen Porzellanschälchen vorgenommen. Nicht zu dünne Schnitte werden mit etwa 5 ccm kurz aufgekocht. Nach 2 bis 3 Stunden erscheinen die Präparate von ausgeschiedenem Kupferoxydul rot und ein roter Niederschlag findet sich auf dem Boden der Porzellanschälchen. Daß Rohrzucker nicht in Reaktion tritt, läßt sich leicht an Präparaten der Zuckerrüben veranschaulichen.

Kurz hingewiesen sei auf den Nachweis mit alkoholischer Kupferazetatlösung von Lidforss²⁾, der durch Anwendung einer alkoholischen Lösung den störenden Einfluß evtl. anwesender, reduzierender und alkohollöslicher Nicht-Glykosen auszuschließen bestrebt ist. Es werden 2 Lösungen vorrätig gehalten, eine alkoholische Lösung von Kupferazetat mit wenig Essigsäure und Glycerin versetzt, sowie eine alkoholische Natronlauge. Zur Reaktion mischt man je einen Tropfen der Lösungen auf dem Objektträger, legt die Präparate ein und bedeckt mit dem Deckglase. Nach einiger Zeit entsteht ein auf die zuckerhaltigen Zellen beschränkter Niederschlag; durch Erwärmen (da eine alkoholische Lösung vorliegt, auf der Asbestplatte oder auf dem Wasserbade) wird die Reaktion beschleunigt. „Was die Empfindlichkeit des Reagens anlangt, so scheint es der Fehlingschen Lösung nicht erheblich nachzustehen und ist dem Barfoed-schen Reagens entschieden überlegen.“

¹⁾ C. Barfoed, Ztschr. f. analyt. Chem., 1873, XII, S. 27.

²⁾ B. Lidforss, Über die Wirkungssphäre der Glykose- und Gerbstoffreagentien, Lunds Univ. Årsskr., 1892, XXVIII, Sep.

Es war oben schon gesagt (S. 183), daß wir mit den Methoden von Sachs und A. Meyer Glykosen neben Saccharosen nachweisen können. Bei kurzem Aufkochen entstehende Niederschläge werden durch Glykosen hervorgerufen, während rohrzuckerhaltige Zellen zunächst nur eine intensiv blaue Färbung annehmen und erst bei längerem Kochen (wobei Rohrzucker invertiert wird) Niederschläge geben. Da aber bei dem längeren Kochen zweifelsohne auch aus anwesenden Glykosiden Zucker abgespalten wird und sich die Glykoside vor der Reaktion schwer entfernen lassen, so ist es vorteilhafter zum Nachweis von Glykosen und Rohrzucker die Verfahren von Czapek¹⁾ und Hoffmeister²⁾ anzuwenden. Hierbei wird der Rohrzucker durch Hefeinvertin invertiert. Das Hefeinvertin wird gewonnen, indem man frische, rasch getrocknete Hefe mit Wasser zu einem dicken Brei anführt, den Brei 12 Stunden bei 40° stehen läßt und dann abpreßt. Das Extrakt wird filtriert und mit Alkohol gefällt. „Der Niederschlag ist ein gelblichweißes in Wasser lösliches Pulver.“ Dieses derart gewonnene Invertin wird in konz. wässriger Lösung benutzt. Diese Invertinlösung zeigt nur kurze Zeit eine zuverlässige Wirkung. Es werden nun Vergleichspräparate, Schnitte aus frischem Material von 3—4 Zelllagen Dicke, in Untersuchung genommen. Ein Teil der Schnitte wird direkt nach A. Meyer behandelt. Ein anderer Teil der Präparate kommt auf dem Objektträger auf wenigstens 3 Stunden in einen Tropfen Hefeinvertinlösung; ist der Tropfen eingedunstet, so wird von neuem befeuchtet; alsdann werden die Schnitte nach kurzem Abspülen mit Wasser in gleicher Weise untersucht. Ist Rohrzucker zugegen, so werden natürlich die Präparate, die in der Invertinlösung lagen, weit stärkere Reaktionen geben, als die anderen, die nur Traubenzucker enthielten oder gar frei von Glykosen waren.

Nun ist zu beachten, daß wohl die Inversion des Rohrzuckers in 3 Stunden meist beendet ist, daß jedoch die Invertinlösung durch starke Membranen sehr schlecht diffundiert. In starkwandige Zellen (Samenendospermen) war die Invertinlösung oft nach 12 Stunden noch nicht genügend eingedrungen. Hoffmeister hält eine dreistündige Einwirkung für ausreichend, doch hat er überwiegend zartwandige Objekte untersucht (starke Wände haben von dem geprüften frischen Material die Samen von *Cocos nucifera* und von dem getrockneten die Samen von *Coffea arabica* und *Castanea vesca*). Mein Befund stimmt überein

¹⁾ F. Czapek, Über die Leitungswege der organischen Baustoffe im Pflanzenkörper, Sitzber. Wiener Akad., 1897, CVI, 1, Sep., S. 14.

²⁾ C. Hoffmeister, Über den mikrochemischen Nachweis von Rohrzucker in pflanzlichen Geweben, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 688.

mit den Erfahrungen von Grüss¹⁾, nach dem Invertinlösung in mit dichtem Plasma erfüllte Zellen gleichfalls schwer eindringt. Es bleibe dahingestellt, ob das Eindringen durch starke Zellmembranen oder durch dichtes Plasma erschwert wird, jedenfalls wird man in Fällen, in denen bei dreistündiger Einwirkung noch kein Rohrzucker nachweisbar ist, zur Sicherheit einige Präparate 12, sogar 24 Stunden in größeren Mengen Invertinlösung belassen, der man als Antiseptikum eine Spur Thymol zusetzen kann. Nach Hoffmeister soll man statt Invertin auch Emulsin zur Spaltung benutzen können; nach meinen Untersuchungen dringt Emulsin aber noch schwerer in die Zellen ein. Glycerin brachte als Inversionsmittel keine Vorteile.

In Präparaten, die neben Rohrzucker große Mengen Traubenzucker enthalten, muß letzterer erst entfernt werden. „Die Schnitte werden direkt in Schälchen mit konz., siedend-heißer Kupfersulfat-Seignettesalz-Natronlauge gebracht, so daß das Oxydationsmittel möglichst rasch und im großen Überschuß einwirken kann. Nach 1—2 Minuten ist die Glukose quantitativ oxydiert“ (Hoffmeister). Das gebildete Kupferoxydul läßt sich beseitigen, indem die Schnitte nach dem Abspülen mit sehr schwacher Weinsäurelösung in eine konz. erwärmte Magnesiumchloridlösung gebracht werden. Sie werden dann nochmals mit Weinsäurelösung abgespült und dürfen jetzt bei kurzem Aufkochen in Fehlingscher Lösung keine Glykosen mehr anzeigen. Werden diese Präparate nun mit Invertinlösung und nachfolgend mit Fehling behandelt, so zeigt ein Niederschlag Rohrzucker an. Mit der Invertinmethode läßt sich, wie Kontrollversuche mit Helianthus-Mark, das mit Rohrzuckerlösung injiziert war, ergaben, noch 0,01% Rohrzucker nachweisen, sowie 0,5% Rohrzucker neben 1 bis 5% Traubenzucker.

Die im Vorstehenden angeführten Methoden verlangen eine kritische Beurteilung. Bekanntlich sind viele Glykoside mehr oder weniger leicht spaltbar. Die Spaltung wird in erster Linie bei längerem Kochen, wie es beim Saccharosenachweis mit Fehlingscher Lösung geschehen muß, erfolgen, aber auch bereits beim kurzen Aufkochen eintreten. Aus diesem Grunde vermeidet Flückiger bei seinem Verfahren ein Erwärmen. Doch selbst bei längerem Verweilen der Präparate in den stark alkalischen Reagentien bei Zimmertemperatur sind hydrolytische Spaltungen keineswegs ausgeschlossen. Somit kann das Resultat bei allen Methoden durch glykosidischen Zucker modifiziert werden. Dies dürfte zuweilen auch beim Saccharosenachweis mit der Invertinmethode eintreten, wenigstens bei Anwesenheit von durch Invertin spaltbaren Glykosiden.

¹⁾ J. Grüss, Über den Umsatz der Kohlehydrate bei der Keimung der Dattel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 42.

Bei den Reaktionen mit Fehlingscher Lösung muß des weiteren berücksichtigt werden, daß außer Zuckerarten der Trauben- und Rohrzuckergruppe noch andere Substanzen (Amylodextrin, Hämatoxylin, Phloroglucin) das Fehlingsche Reagens reduzieren.

Zu den genannten Nachteilen kommt noch hinzu, daß sich die Niederschläge von Kupferoxydul auf längere Zeit weder in Glyzerin noch in Kanadabalsam halten, daß sich die Belegobjekte nicht als Dauerpräparate aufheben lassen.

Da bietet nun der Nachweis mit Phenylhydrazin von Senft¹⁾, den dieser in Anlehnung an die makrochemischen Befunde von Fischer²⁾ ausarbeitete, ganz bedeutende Vorteile. Letzterer hat gezeigt, daß Zuckerarten mit überschüssigem Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung beim Erwärmen kristallinische, gelbe Körper, Osazone, liefern. Schon früher wurde Phenylhydrazin von Lidforss mikrochemisch versucht, aber ohne Erfolg. Benutzt werden mit Senft salzsaures Phenylhydrazin

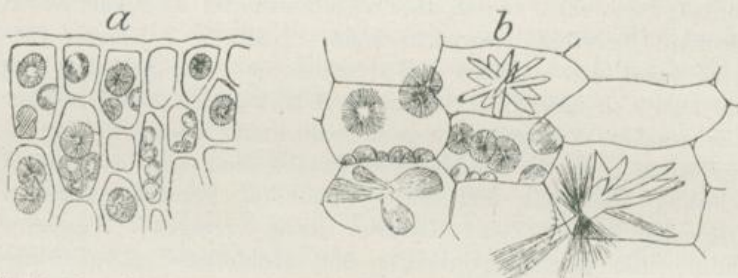


Fig. 49. Osazonkristalle mit Phenylhydrazin, a) *Strychnos nux vomica* (Endosperm), b) *Vitis vinifera* (Fruchtfleisch) (Tannmann).

und essigsaurer Natron, die in Glyzerin (1:10) gelöst, getrennt in braunem Glase aufbewahrt werden. Die Phenylhydrazinlösung wird mit der Zeit tiefbraun, behält aber ihre Wirksamkeit, wenigstens erweisen sich fast 6 Jahr alte, häufig gebrauchte Lösungen noch völlig wirksam. Zum Nachweis wird von jeder Lösung ein Tropfen auf den Objektträger gebracht; die Tropfen werden gemischt, die Präparate eingetragen und das Deckglas aufgelegt. Anwesende Zucker scheiden sich als gelbe Osazone in Gestalt von mehr oder weniger deutlich sphärokristallinen Kugeln oder von zu Sternen, Büscheln und Garben gruppierten Nadeln aus; seltener bilden sich derbe Spieße oder Tafeln (wetzsteinförmig). Zuweilen ist die kristallinische Natur der Ausscheidung kaum zu erkennen, es entstehen Ballen und Klumpen oder feinkörnige Fällungen (Fig. 49).

¹⁾ E. Senft, Über den mikrochemischen Zuckernachweis durch essigsaurer Phenylhydrazin, Sitzber. Wiener Akad., CXIII, Abt. 1, Febr. 1904.

²⁾ E. Fischer, Synthesen in der Zuckergruppe, Ber. chem. Ges., 1890, XXIII, S. 2114.

Es empfiehlt sich, die Präparate zunächst ohne Anwendung von Wärme einer Dauerbeobachtung zu unterziehen. Zuerst (im Verlaufe einiger Stunden) scheidet sich Fruchtzucker aus, während Traubenzucker erst nach einem oder mehreren Tagen auskristallisiert und Rohrzucker in diesen ohne Wärme hergestellten Präparaten überhaupt nicht gefällt wird. Werden nun Präparate, die bei zweitägigem Liegen bei Zimmertemperatur keine Kristallbildungen aufweisen, auf der Asbestplatte oder auf dem Wasserbade einige Zeit erhitzt (etwa 30—40 Minuten) und erfolgt erst jetzt Kristallbildung, so ist nur Rohrzucker zugegen. Sollten bereits bei Zimmertemperatur Fällungen entstanden sein, dann zeigt sich der Rohrzucker durch Neubildung von Kristallen beim Aufkochen der Präparate an. Wendet man von vornherein Wärme an, so erfolgt die Ausscheidung weit schneller und die Kristalle sind besser ausgebildet. Doch sind hiermit nur Nachteile verbunden, denn die Kristalle treten meist aus den Zellen heraus und außerdem ist eine Unterscheidung von Frucht-, Trauben- und Rohrzucker nicht mehr möglich.

Senft hatte seine Methode zunächst an Früchten (*Ceratonia*, *Ficus*, *Pirus*, *Phoenix*, *Vitis*, *Coffea*), Blättern (*Convallaria*, *Maranta*, *Crassula*, *Canna*), Trichomen (*Verbascum*) und Algen erprobt (Fig. 49). Tichomirow¹⁾ hat später viele Pflanzen auf Zucker mit diesem Verfahren geprüft und in allen untersuchten Fällen Zucker nachweisen können. Negative Resultate erhielt er nur bei *Lemna triscula* und *Atropa belladonna* (Begründung s. S. 175, Anmerk. 2). — Das Senftsche Verfahren hat schließlich den Vorteil, daß sich die Präparate in Glycerin-Gelatine als Dauerpräparate aufheben lassen. — In neuerer Zeit hat Riegler²⁾ oxalsaures Phenylhydrazin als Glykosereagens benutzt.

Grafe³⁾ führte das sekundäre asymmetrische Methylphenylhydrazin ein, welches nur mit Ketozucker, nicht mit Aldozucker ein Methylphenylosazon bildet⁴⁾. Da aber Sorbose nur ein sirupartiges Osazon liefert, so ist Methylphenylhydrazin ein spezifisches Reagens auf Fruktose, allerdings nur bei einem Mindestgehalt von 008⁰/₀⁵⁾.

¹⁾ W. Tichomirow, Sur la valeur de la réact. micro-chimique de la Phénylhydrazine, Ann. du Jard. de Buitenzorg, Leide, 1910, Suppl. III, S. 537.

²⁾ Riegler, Zuckerpr. mit oxalsaurem Phenylhydrazin, Deutsch. med. Wochenschr., 1903, XXIX, Nr. 15.

³⁾ V. Grafe, Studien über den mikrochemischen Nachweis verschiedener Zuckerarten in den Pflanzengeweben mittels der Phenylhydrazinprobe, Sitzber. Wien. Akad., 1905, CXIV, Abt. 1, S. 15.

⁴⁾ C. Neuberg, Ber. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 959.

⁵⁾ Das Methylphenylhydrazin muß völlig frei von Phenylhydrazin sein (bei Merck, Kahlbaum u. a. zu erhalten). Die Selbstdarstellung ist umständlich. Eine Vorschrift gibt Grafe (l. c. S. 18). Das Reagens wird 1 : 10 in Glycerin

Es entstehen in kalt behandelten Präparaten gewöhnlich erst in 2—4 Tagen Ausscheidungen von Fruktosemethylphenylosazon (gelbe bis braune Garben, Sphärite und Schollen, die aus heißem Alkohol umkristallisiert werden können). Die Kristallbildung erfolgt schneller bei mehrstündigem Erwärmen auf 40° oder bei bis 10 Minuten langem Erhitzen auf dem Wasserbade (Fig. 50). Beim Einhalten dieser Temperaturen wird Rohrzucker nicht durch das Glycerin invertiert. In Verbindung mit dem Senftschen Verfahren läßt sich nun einwandfrei Dextrose, Fruktose und Saccharose nachweisen.

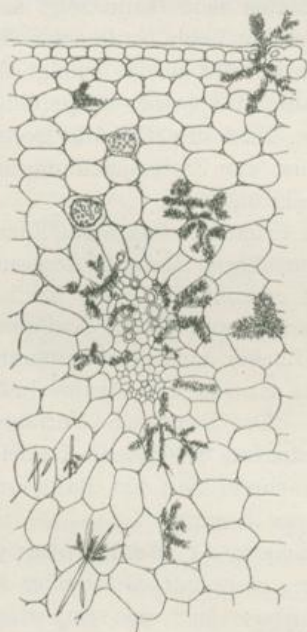


Fig. 50. *Urginea maritima*.
Fruktosenachweis mit Methylphenyl-
hydrazin (10 Minuten erwärmt)
(Tunmann).

Bei allen Vorzügen erfordert die Phenylhydrazin-Reaktion immerhin eine kritische Beurteilung, andernfalls Irrtümer nicht ausgeschlossen sind. Senft sowohl wie Tichomirow halten die bei der Reaktion entstehenden Kristalle in den Staubfadenhaaren der Verbascumblüten für freien Zucker. Doch beweist die leichte Löslichkeit der Kristalle in verdünnten und konzentrierten Alkalien mit tiefgelber Farbe, daß es kein Zucker sein kann (vergl. Hesperidin). Da bei der Reaktion Glycerinlösungen benutzt werden, so scheiden sich außer den Osazonen alle jene Substanzen mit aus, die in Glycerin allein zur Ausscheidung gelangen (Hesperidin, Inulin u. a.). Auf die gelbe Farbe der Kristalle und ihre Formen ist gar kein Wert zu legen, da bekanntlich die sich ausscheidenden Substanzen Farbstoffe aus dem Gewebe und der Reagenslösung mitreißen und so, zumal wenn sie nicht ganz rein sind, gefärbt erscheinen. Es müssen somit alle bei der Phenylhydrazin-Reaktion er-

haltenen Ausscheidungen in jedem einzelnen Falle genau als Osazone identifiziert werden, was bei kleinkörnigen Niederschlägen nicht immer ganz leicht ist. Nach Tichomirow sind die Osazone unlöslich in Wasser, Glycerin, Säuren, löslich in Alkohol, schwer löslich in Chloralhydrat; sie widerstehen Alkalien und Senft benutzt 30% Kalilauge

gelöst und zwar kalt unter Umschütteln. Die Lösung wird bald dunkelrot, darf aber nur schwachen Geruch zeigen und wird wie das Senftsche Reagens mit Natriumazetat benutzt.

und 60% Chloralhydratlösung zum nachträglichen Aufhellen der Präparate; er bemerkt auch, daß die Osazone erst bei längerer Einwirkung von kaltem Alkohol gelöst werden.

An dieser Stelle sei auf das zur Untersuchung zu benutzende Material eingegangen, auf dessen Beschaffenheit man sonderbarerweise in sehr vielen Fällen wenig Gewicht gelegt hat. Handelt es sich darum lediglich „Zucker“ nachzuweisen, so läßt sich sowohl frisches als auch getrocknetes, oft auch in Alkohol eingelegtes Material benutzen. Nun wollen wir aber mit unseren Methoden die nativ in den Zellen auftretenden Zucker (Trauben-, Frucht-, Rohrzucker) nachweisen und nicht glykosidisch gebundenen Zucker. Glykoside sind zum Teil leicht spaltbar und daher liefert der Nachweis des Zuckers (s. oben) bei dem längeren Kochen mit Fehling keine sicheren Resultate. Tichomirow hat bei seinen Arbeiten ganz überwiegend getrocknetes Material herangezogen. Er benutzte Phenylhydrazin und sah vom Erwärmen ab. Trotzdem läßt sich nun nicht angeben, inwieweit sich bei seinen Reaktionen glykosidische Zucker beteiligen. Denn die zahlreichen Arbeiten der Chemiker¹⁾ haben erwiesen, daß beim Trocknen der Pflanzen allenthalben enzymatische Spaltungen der Glykoside eintreten und auch beim schnellen Trocknen, wie es bei Herbarmaterial geschieht, nicht ausgeschlossen sind. Sogar bei Verwendung von Alkoholmaterial ist Vorsicht geboten. Werden doch in 60–70% Alkohol keineswegs alle Fermente abgetötet, so daß Glykoside sich in derart aufbewahrt Material zersetzen können, wie Bridel²⁾ beim Gentiopikrin der Wurzel von *Gentiana lutea* nachwies. Auf die Konzentration des zum Konservieren benutzten Alkohols wird meist wenig geachtet. Zum einwandfreien Nachweis von Frucht-, Trauben- und Rohrzucker muß somit bei jeder Methode lebendes Material benutzt werden. Für die Untersuchung auf Rohrzucker darf kein Alkoholmaterial benutzt werden, da 1 Teil Rohrzucker sich bereits in 100 Teilen 90% Alkohol löst. Enzymatische Spaltungen können übrigens beim Einlegen der Präparate in Phenylhydrazin auf ein bis zwei Monate, wie es Tichomirow machte, ebenfalls eintreten, selbst bei Benutzung lebenden Materials.

Den Zucker der Nektarien weist Knuth³⁾ teils mit Fehling'scher Lösung nach, teils wendet er als Reagens Ortho-Nitrophenol-Propiolsäure an, welche Hoppe-Seyler empfohlen hatte und die bei Gegenwart von Traubenzucker eine Indigoblau-Fällung liefert. Die ganzen Blüten werden 24 Stunden in Fehling- oder in Orthonitrophenol-propiolsäure mazeriert, dann darin aufgekocht, in kaltem Wasser ausgewaschen und untersucht.

Auf einem anderen Wege sucht Molisch⁴⁾ Zucker nachzuweisen.

¹⁾ Vornehmlich Bourquelot im Journ. d. Pharm. et d. Chim.

²⁾ M. Bridel, Journ. de Pharm. et de Chim., 1911, 7, III, S. 534.

³⁾ P. Knuth, Nachweis von Nektarien auf chemischem Wege, Bot. Zentralbl., 1898, LXXVI, S. 76.

⁴⁾ H. Molisch, Zwei neue Zuckerreaktionen, Sitzber. Wiener Akad., 1886, XCIII, 2. Abt., S. 912.

Er fand daß Zuckerlösungen, mit einigen Tropfen einer 15–20% alkoholischen α -Naphthollösung und Schwefelsäure versetzt, eine violette Farbenreaktion geben. Nachfolgender Wasserzusatz bedingt einen blau-violetten Niederschlag. Zuckerlösungen in gleicher Weise mit Thymol-Schwefelsäure behandelt, werden zinnoberrot. Derart lassen sich noch 0,00001 % Zucker nachweisen. Rohrzucker, Milchezucker, Traubenzucker, Fruchtzucker, Maltose geben die Reaktion, nicht aber Inosit. Auch mit Kohlehydraten und mit Glykosiden erhält man die gleichen Farbenreaktionen, doch treten sie erst nach einiger Zeit ein, nachdem die Schwefelsäure Zucker aus den Glykosiden abgespalten hat. Doch wird die Reaktion, die auf der Bildung von Furfurol beruht, auch durch Vanillin und Eiweißsubstanzen hervorgerufen (Nickel)¹⁾. Zur Ausführung der Reaktion bringt man nicht zu dünne Präparate auf dem Objektträger in einen Tropfen einer 15–20% alkoholischen α -Naphthollösung und fügt 2–3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so daß der Schnitt von der Säure völlig bedeckt ist. Bei Anwesenheit von Traubenzucker, Fruchtzucker, Milchezucker, Rohrzucker, Inulin wird der Schnitt augenblicklich violett. Sind aber nur Kohlehydrate oder Glykoside zugegen, deren Zucker erst durch die Schwefelsäure hydrolytisch abgespalten werden muß, dann erfolgt die Reaktion erst nach 15 Minuten. Weiteren Aufschluß liefern nun Vergleichspräparate. Man stellt zwei gleiche Schnitte her, entfernt aus dem einen durch kurzes Aufkochen in Wasser den Zucker und führt dann mit beiden Schnitten auf einem Objektträger die Reaktion aus, die jetzt in dem gekochten Schnitt viel später eintreten wird. Gegenwärtig benutzt man die Reaktion, der nur ein orientierender Wert zukommt, nur selten.

Die von Kraus²⁾ angegebene sogenannte „morphologische Methode“, die darin besteht, daß man die zu prüfenden Objekte in Glycerin oder Alkohol einträgt (Ausscheidung der Zuckerarten in Tröpfchen), wird man nur gelegentlich nebenbei als Hinweis berücksichtigen, falls nämlich gerade Material in konzentriertem Glycerin oder Alkohol vorliegt. So hat Mac Dougal³⁾ durch Einlegen in 70% Alkohol Rohrzuckerkörnchen in Isopyrumknollen, besonders zur winterlichen Ruheperiode aufgefunden. Glycerin war weniger wirksam, Äther und Chloroform erwiesen sich als unbrauchbar. Die ausgeschiedenen Kügelchen waren in lebhafter Molekularbewegung. Einen sicheren Schluß gestattet diese Methode

¹⁾ E. Nickel, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen, vergl. ferner A. Reinbold, Über die Molisch-Udranskysche α -Naphthol-Schwefelsäure-Reaktion, Arch. ges. Ph., 1904, CIII, S. 581.

²⁾ G. Kraus, Über das Verhalten des Zuckersaftes der Zellen gegen Alkohol und Glycerin und die Verbreitung des Zuckers, Bot. Ztg., 1876, XXXIV, S. 603.

³⁾ D. T. Mac Dougal, A contribution to the physiology of the root tubers of *Isopyrum biternatum*, Minnesota Botan. Studies Bull., 1896, S. 501.

nicht. Einmal gelangen unreine Zuckerlösungen, wie sie in den Pflanzen vorkommen, ungemein schwer in Glycerin zur Abscheidung, dann ist völlig konzentriertes Glycerin nicht immer zur Hand, da dasselbe bekanntlich sehr leicht Wasser anzieht (schon beim wiederholten Öffnen des Gefäßes). Spuren von Wasser im Glycerin vermögen schon größere Quantitäten von Zucker in Lösung zu halten. Außerdem läßt sich eine Diagnose der ausgeschiedenen und von Zuckerarten herrührenden Tröpfchen wohl gegenüber dem Inulin und den Gerbstoffen leicht durchführen, doch bleiben wir ganz im ungewissen über andere in gleicher Form sich ausscheidende Substanzen, deren Natur uns unbekannt ist. Zur Kristallisation, die übrigens wenig beweist, kommt es nur in günstigen Fällen. Nach den makrochemischen Versuchen von Senft¹⁾ geben gesättigte wässrige Lösungen von Maltose und Laevulose beim Vermischen mit etwas Glycerin selbst bei nachfolgendem Eindampfen keine Kristalle.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß konzentrierte Schwefelsäure bei Gegenwart von Eiweiß und Zucker Rotfärbung im Gewebe hervorruft. Es würde die Reaktion (Raspailsche²⁾ Reaktion) auf Zucker deuten, sowohl auf freie Zuckerarten als auch auf gebundene. Da die gleiche Reaktion aber durch viele Alkaloide u. a. hervorgerufen wird, so berechtigt sie allein zu gar keinem sicheren Schluß.

Auch sei noch bemerkt, daß man zuweilen Zucker mit heißem Paraffin zur Abscheidung bringen kann; die Objekte werden 3 bis 5 Minuten unter Deckglas in Paraffinöl aufgekocht. Der Vorteil der Methode besteht darin, daß sich die Kristalle rein weiß in sehr großen Individuen abscheiden und zwar stets am Deckglasrande. Sie können somit isoliert und mit Phenylhydrazin weiter geprüft werden. In Betracht kommt das Verfahren, wenn braune (tief gefärbte) Pflanzepulver vorliegen, in denen man die Osazonkristalle nur schlecht erkennen kann. Doch gelingt die Abscheidung nicht immer und als weiterer schwerwiegender Nachteil kommt hinzu, daß die Kristallisation oft mehrere Wochen beansprucht.

Inulin.

Inulin, ein Polysaccharid ($3(C_{12}H_{20}O_{10}) + H_2O$ [Kilian]), $6(C_6H_{10}O_5) + H_2O$ [Tanret]), wurde 1804 von Valentin Rose in *Inula helenium* entdeckt und von Thomson benannt. Mit der Mikrochemie beschäftigten sich zunächst eingehender Sachs³⁾ und Kraus⁴⁾. Es wird aus zerriebenen Dahlienknollen (Herbstmaterial) hergestellt, die man unter Zusatz von kohlensaurem Kalk auskocht. Das eingeeengte Extrakt liefert beim Ausfrieren Inulin, welches durch Waschen mit Alkohol und Äther gereinigt wird. Inulin ist hygroskopisch, löslich

¹⁾ E. Senft, Der mikrochemische Nachweis des Zuckers, Zeitschr. d. allg. österr. Apoth. Ver., 1904, XLVIII, Nr. 13.

²⁾ Raspail, Chim. organique 1839, II, S. 139.

³⁾ J. Sachs, Bot. Ztg., 1864, XXII, S. 77.

⁴⁾ G. Kraus, Bot. Ztg., 1875, XXXIII, S. 171.

in Wasser, unlöslich in Glyzerin und Alkohol, färbt sich nicht mit Jodreagentien, reduziert ammoniakalisches Silbernitrat, aber nicht Fehlingsche Lösung und gibt bei der Hydrolyse und bei Einwirkung des Enzyms Inulase (Green, Lit. s. S. 198, 2) Fruktose.

Inulin ist in der lebenden Zelle im Zellsaft gelöst, es vermag also direkt zu wandern. Es findet sich namentlich in Compositen und in den diesen nahestehenden Familien, Campanulaceen, Lobeliaceen, Goodeniaceen, Stylidiaceen, ferner in Violaceen (*Jonidium ipecacuanha*, bei der Bestimmung falscher *Ipecacuanha* diagnostisch wichtig) und in einigen Monokotylen (*Leucojum*, *Galanthus*, *Allium*, *Hyacinthus*, *Narcissus*). Das Inulin verschiedener *Kleinia*-Arten wurde von Kahns¹⁾ studiert. Nägeli²⁾ und Cramer³⁾ gaben Inulin im Zellsafte einiger Algen an (*Botryophora occidentalis*, *Acetabularia*, *Polyphysa*), was noch nachzuprüfen wäre. Es vertritt vollkommen die Stärke, häuft sich ebenso wie diese in den unterirdischen Reservestoffbehältern im Herbst an, um im Frühling verbraucht zu werden. So fand sich in *Rad. taraxaci*⁴⁾ im Herbst 24%, im März 1,74%, in *Rad. pyrethri* im Herbst 57,7%, im Frühling 19% Inulin. Demgemäß schwankt der Gehalt in Drogen je nach der Zeit der Einsammlung. Rundquist⁵⁾ gibt folgenden Prozentgehalt an: *Rad. artemisiae* 9,66, *Rad. bardanae* 46,25, *Rad. carlinae* 17,87, *Rad. eichorii* 18,50, *Rad. farfarae* 17,40, *Rad. helenii* 35,10, *Rad. pyrethri germ.* 26,19, *Rad. pyrethri roman.* 35,66, *Rad. scorzonerae* 31,64, *Rad. taraxaci* 39,65, *Rhiz. arnicae* 5,55. Zur Blütezeit schwindet Inulin fast ganz⁶⁾.

Auch in den oberirdischen Teilen dieser Pflanzen trifft man Inulin an, so in Blättern (*Tussilago farfara*⁷⁾), in Blütenköpfchen (*Cynara scolymus*). Doch führen Chlorophyllkörner, Schließzellen der Spalten, Siebröhren und Stärkescheiden nach Kraus stets Stärke. Im Samen ist Inulin mit Sicherheit nicht ermittelt worden⁸⁾. Nach Behrens und G. Meyer⁹⁾ soll es im Topinamburstengel in den Gefäßen vorkommen und in diesen zu den Knollen herabwandern. Die Ansicht de Candolles, nach der *Helianthus tuberosus* in den Tropen statt Inulin Stärke bilden soll, trifft nach Kraus⁹⁾ wenigstens bei in Java kultivierten Pflanzen nicht zu.

In den lebenden Zellen ist Inulin nicht wahrnehmbar, da es im Zellsaft gelöst ist. Ist es aber in sehr beträchtlichen Mengen zugegen,

¹⁾ H. Kahns, Zur Kenntnis der physiologischen Anatomie der Gattung *Kleinia*, Kieler Dissertation, 1909.

²⁾ C. Nägeli, Sitzbr. bayr. Akad., 1862.

³⁾ C. Cramer, Denkschr. Schweiz. nat. Ges., 1887, XXX, S. 16.

⁴⁾ Dragendorff, Materialien zu einer Monographie des Inulins. Petersburg, 1870.

⁵⁾ C. Rundquist, Farmac. Notisblad, 1904.

⁶⁾ K. Prantl, Das Inulin, München 1870.

⁷⁾ W. Mitlacher, Pharm. Post, 1902, XXXV, S. 377.

⁸⁾ G. Meyer, Über Inhalt und Wachstum der Topinamburknollen, Ber. d. bot. Ges., 1895, XIII, S. 184.

⁹⁾ G. Kraus, Botanische Notizen, Ztschr. f. Bot., 1909, I, S. 526.

wie in den Kompositenwurzeln des Herbstes, und bringt man ein derartiges Präparat lebenden Materials unter Deckglas in einen Tropfen Wasser, dann bemerkt man größere oder kleinere, fast farblose, glänzende Tröpfchen in den Zellen auftreten, die oft ineinander fließen und sich vergrößern, bei Zusatz von neuen Wassertropfen aber wieder verschwinden. Diese Tropfen sind ausgeschiedenes Inulin, da 1 Teil Inulin ungefähr 5000 Teile Wasser zur Lösung erfordert. Inulin ist in Alkohol (selbst in 65%) und in Glyzerin unlöslich; es gelangt daher bei Einwirkung dieser Reagentien zur Ausscheidung, sowohl beim Einlegen von Präparaten unter Deckglas als auch beim Eintragen größerer oder kleinerer Pflanzenstücke in diese Flüssigkeiten. Auch beim Trocknen der Pflanzen (bei Wasserentzug, also ebenfalls beim Gefrieren) scheidet es sich aus, so daß wir es in Herbarmaterial und in den Drogen antreffen.

Legt man Präparate frischen Materials unter Deckglas in absoluten Alkohol, dann scheidet sich zuweilen das Inulin in Form eines feinen kristallinischen Mehles ab. Bringt man Pflanzenteile auf eine Woche und länger in 65–70% Alkohol oder in Glyzerin und stellt aus diesem

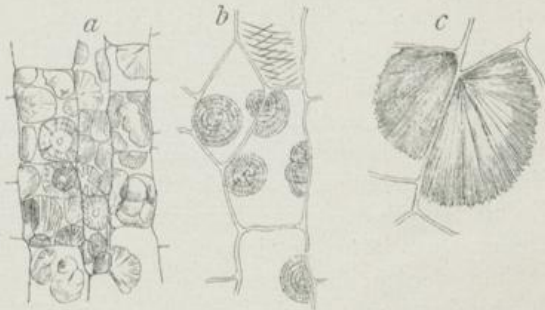


Fig. 51. Inulinausscheidungen, a) *Inula helenium* (Wurzel-droge), Schnitt einige Zeit in Wasser, radiale Schichtung deutlich, konzentrische selten; b) *Dahlia variabilis* (Knolle, Alkoholmaterial), radiale und konzentrische Schichtung gut sichtbar; c) *Lappa spec.* (Wurzel), Schnitt kurze Zeit in Chloralhydrat-Glyzerin, konzentrische Schichtung fehlt (Tunmann).

Material Präparate her, so finden wir das Inulin in gut ausgebildeten, den Zellwänden oft anliegenden kugeligen Sphärokristallen. Hierbei gelangt es auch an sekundäre Lagerstätten (in die Gefäße), wie es schon Prantl angibt; die Ansicht von G. Meyer¹⁾, nach dem Inulin hauptsächlich in den Gefäßen wandern soll, erscheint zweifelhaft. Wenigstens zeigten frische Längsschnitte von *Helianthus tuberosus* nur im Parenchym Inulin. Molisch fand es auch in Milchsäften. Sollten die Sphärokristalle nicht gut ausgebildet sein, dann läßt sich ein besserer Einblick durch kurze Behandlung mit alkoholischer Chloralhydratlösung gewinnen. Die Sphärokristalle lassen nun einen deutlich strahlig radialen Bau und eine konzentrische Schichtung erkennen. Trichite

¹⁾ G. Meyer, Beiträge zur Kenntnis des Topinamburs, Ber. d. bot. Ges., 1896, XIV, S. 347.

(feine, das Licht doppelbrechende Kristallnadeln) sind radial in konzentrische Schichten angeordnet (Fig. 51 a, b). Sie zeigen das schwarze Kreuz im polarisierten Licht und bei Einschaltung des Gipsplättchens Rot I die gleichen Additions- und Subtraktionsfarben wie die Stärkekörner (S. 50). In Drogen lassen die Sphärokristalle ihren Bau oft undeutlich hervortreten. Es rührt dieses daher, daß sich an und in dem Inulinkristall andere amorphe und in Glycerin und in Alkohol nicht leicht lösliche Polysaccharide abgeschieden haben, welche die Trichite gewissermaßen verkitten. Diese „amorphen“ Polysaccharide¹⁾, die das Inulin in den Zellen begleiten (s. unten), lösen sich eben bei Zusatz von Chloralhydratlösung oder von verdünnter Salpetersäure zuerst auf, so daß der strahlig radiale Aufbau schärfer hervortritt. Auch bei längerem Verweilen der Präparate in wenig Wasser erscheinen die Kristalle schärfer. Nach H. Fischer²⁾ sind die Sphärite in Wasser quellbar, schmelzen aber beim Erwärmen in Wasser wie langsam lösliche Kristalle ab.

In Drogen und in Herbarmaterial findet man die Zellen oft ganz mit großen Klumpen gefüllt (besonders bei Wurzeln aus dem Herbst), die eine Vorstellung von den großen Quantitäten von Inulin geben, die die lebende Zelle in Lösung zu halten vermag. Die Lösung dieser großen Quantitäten in der lebenden Zelle muß durch andere Körper bedingt werden, nach Tunmann³⁾ durch andere Polysaccharide oder durch phosphorsauren Kalk. Und Hartwich⁴⁾ hat in der Tat schon 1904 gefunden, daß in vitro Zusatz einer Spur Pflanzenschleim zur Herstellung einer sehr stark übersättigten Inulinlösung genügt. Überwiegend bezeichnet die Literatur die glasigen Klumpen, die scharfe Kanten und einen muschligen Bruch zeigen und beim Präparieren aus den angeschnittenen Zellen oft herausfallen, als amorph. Eingehende Betrachtungen zeigen indessen, daß auch in den Klumpen das Inulin in feinen Kristallen auftritt. Hiervon kann man sich teils ohne weiteres an geeigneten Stücken überzeugen, teils bei Zusatz von

¹⁾ Die genaue Natur dieser Polysaccharide ist noch unbekannt. Möglicherweise handelt es sich um mehrere Substanzen (Gummi). Auch Laevulose läßt sich in Inulinzellen meist nachweisen, wenigstens fand ich mit Phenylhydrazin Laevulose in *Rad. bardanae*, — *enulae*, — *pyrethri*, — *cichorii*, — *taraxaci*. Beachtenswert ist ferner das gleichzeitige Vorkommen von Kalziumphosphat.

²⁾ H. Fischer, Über Inulin, sein Verhalten innerhalb und außerhalb der Pflanze, *Cohns Beitr.*, 1898, VIII, S. 53.

³⁾ O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Inulins, *Ber. d. pharm. Ges.*, 1910, XX, S. 577.

⁴⁾ C. Hartwich, Beitr. z. Kenntnis der *Ipecacuanhawurzeln*, *Arch. d. Pharm.*, 1904, CCXLII, S. 669.

Chloralhydratlösung. Es scheint, daß bei dem langsamen Wasserentzug die anderen bereits erwähnten Polysaccharide sich inniger dem auskristallisierenden Inulin anfügen und derart die kristallinische Struktur der Klumpen verdecken. — Von Bütschli wird den Sphärokristallen eine Wabenstruktur zugeschrieben, eine Ansicht, die von Puriewitsch¹⁾ bestätigt wird.

Inulin in größerer Menge ist in reinem kaltem Wasser (unter Deckglas) nur schwer löslich. Bei jahrelangem Aufbewahren der Präparate oder der Pflanzenteile in Alkohol wird die Löslichkeit in Wasser herabgesetzt²⁾. Stets löst es sich aber beim Erwärmen in Wasser und in Glyzerin, ferner in Essigsäure, Ammoniak, Kupferoxydammoniak, Kalilauge und Mineralsäuren, und zwar in den letzten beiden Reagentien (im Gegensatz zum Hesperidin) ohne Farbenerscheinung. Jodreagentien färben nicht oder doch nur wenig hellgelb. Chlorzinkjod löst farblos. Wasserlösliche Farbstoffe färben die Ausscheidungen schwach, die Farbstoffe werden aber nicht gespeichert³⁾. Sie verhalten sich in dieser Hinsicht ähnlich wie die Stärkekörner. Zur Diagnose fand ich die Färbungen nicht verwertbar. Am besten färben stark verdünnte wässrige Lösungen von Fuchsin, Safranin, Chrysoidin, Malachitgrün, Methylgrün, Jodgrün, Gentianaviolett (H. Fischer⁴⁾).

Anlaß zur Verwechslung können bei optischer Betrachtung Kalziumphosphat, Hesperidin und harziges Sekret geben. Letzteres wird aus den schizogenen Gängen (Compositenwurzeln) bei der Präparation durch das Messer auf und in Parenchymzellen übertragen und sieht bisweilen in Gestalt dem Inulin ähnlich. Diese Sekretmassen lösen sich jedoch zum größten Teil in Alkohol, färben sich ferner mit Jodjodkalium und Chlorzinkjod meist dunkelbraunrot. Kalziumsphärite (bei Alkoholmaterial) lösen sich langsam in Wasser unter Deckglas (Durchsaugen von Wasser) und Zusatz von Schwefelsäure bewirkt braungelbe Färbung, dann Bildung von Kalziumsulfatkristallen. In vegetativen Teilen der Kompositen und Lobeliaceen können schließlich Verwechselungen mit Hesperidin unterlaufen. Hesperidinausscheidungen sind aber in heißem Wasser unlöslich und werden von Alkalien mit gelber Farbe gelöst.

¹⁾ K. Puriewitsch, Über die Wabenstruktur d. pflanz. org. Körper, Ber. bot. Ges., 1897, XV, S. 239.

²⁾ H. Leitgeb, Über die durch Alkohol in Dahliaknollen hervorgerufenen Ausscheidungen, Bot. Ztg., 1887, XLV, S. 129.

³⁾ H. Fischer, Stärke und Inulin, Beih. z. bot. Zentralbl., 1902, XII, S. 226.

⁴⁾ H. Fischer, Mikrophotogr. von Inulinsphäriten u. Stärkekörnern, Ber. deutsch. bot. Ges., 1903, XXI, S. 107.

Zum Nachweis von Inulin wendet man schließlich einige Reaktionen an, die auf Bildung von Furfurol und Methylfurfurol beruhen. Nach Molisch¹⁾ betupft man nicht zu dünne Schnitte auf dem Objektträger mit einem Tropfen einer 15- bis 20%igen alkoholischen α -Naphthol-lösung, fügt dann vom Deckglasrande 2—3 Tropfen Schwefelsäure zu und erwärmt eventuell gelinde. Inulin löst sich mit violetter Farbe. Benutzt man eine 15- bis 20%ige alkoholische Thymollösung, dann entsteht eine karminrote Färbung. Green²⁾ befeuchtet die Präparate mit einer alkoholischen Lösung von Orcin, legt das Deckglas auf, fügt konzentrierte Salzsäure zu und erhitzt. Hierbei löst sich Inulin mit orangeroter Farbe. Die Reaktion wurde von Meyer und Behrens für gut befunden. Wendet man eine alkoholische Phloroglucinlösung an, so tritt braunrote Lösung ein. Doch möchte ich darauf hinweisen, daß Paragalaktane (Endosperm von *Lupinus*) bei dieser Reaktion ebenfalls rötliche Farbenreaktionen geben. In gleicher Weise gibt Hydrochinon-salzsäure mit Inulin eine braune Färbung.

Da bei diesen Verfahren die Säuren in konzentrierter Form herangezogen werden, die teils das Gewebe sofort zerstören (Schwefelsäure), teils zu stark und zu schnell hydrolysieren, so empfiehlt Tunmann (l. c.) folgende Methode: Die Schnitte müssen einer Vorbehandlung unterworfen werden, bestehend in einer achttägigen Mazeration in Weinsäure-Alkohol (zur Entfernung der Alkaloide), in einer möglichst langen (8—10 Wochen) Mazeration in Alkohol (zur Härtung des Inulins). Sie vertragen nun ein genügend langes Auswaschen mit Wasser zur Entfernung von Zucker und Pflanzensäuren (Weinsäure³⁾) und werden jetzt mit Pyrogallol- oder Resorcinsalzsäure (0,1 in 5,0 Alkohol und 5,0 konzentrierter Salzsäure) behandelt; erstere färbt bei kurzem gelinden Erwärmen violettrot, letztere zinnoberrot. Membransubstanzen, ebenso Amylum, treten beim gelinden Erwärmen in der verdünnten Säure des Reagens nicht mit in Reaktion.

Eine Anzahl dem Inulin nahestehender Polysaccharide sind in chemischer Hinsicht noch recht mangelhaft untersucht, die Ergebnisse zeigen noch wenig Übereinstimmung. Mikrochemisch sind diese Körper nicht erforscht. Zu dieser

¹⁾ H. Molisch, Zwei neue Zuckerreaktionen, Sitzber. Wiener Akad., 1886, XCIII, Abt. II, S. 912.

²⁾ J. R. Green, On the germination of the tuber of the Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*), Annals of Botany, 1889, I, S. 223.

³⁾ Weinsäure und weinsäure Salze werden mit Resorcin-Schwefelsäure violettrot, aber nur beim Aufkochen und nicht bei Gegenwart von Nitraten. Laevulose wird mit Resorcinsalzsäure eosinrot; sie wird an mit Alkohol gehärteten Schnitten durch Wässern leicht entfernt, wie die Kontrolle mit Phenylhydrazin zeigt.

Gruppe zählen u. a. folgende Substanzen: Die von Tanret¹⁾ aus Topinamburknollen durch fraktionierte Fällung mit Baryumhydroxyd isolierten Körper, Pseudoinulin (Körner), Inulin (mikroskopische Nadeln), Helianthin (mikroskopische Sphärite), Synanthrin (amorph). In Liliaceen kommt das von Schmiedeberg²⁾ entdeckte Sinistrin vor, das mit dem Scillin von Riche und Rémont³⁾ identisch sein soll und, wie A. Meyer⁴⁾ fand, in den Liliaceen allgemein verbreitet ist und in den Blättern die Stärke vertritt. Diesem nahe verwandt oder gar identisch ist das Irisin, das Wallach⁵⁾ im Rhizom von *Iris pseudacorus*, Blezinger⁶⁾ in *Iris sibirica* fand. Hierher gehört ferner das Triticin der Rhizoma Graminis, welches H. Müller⁷⁾ zuerst darstellte und beschrieb. Nach H. Keller⁸⁾ sollen Irisin und Triticin identisch sein. In Kryptogamen und zwar in Cyanophyceen hat A. Fischer⁹⁾ ein neues Polysaccharid als Anabänin (s. d.) beschrieben, welches ein Kondensationsprodukt des Glykogens sein soll. Die angeführten Polysaccharide vertreten die Stärke und kommen gelöst im Zellsafte vor, sammeln sich als Reservestoffe bei höheren Pflanzen in den unterirdischen Reservestoffbehältern an, um beim Eintritt der Vegetation als Baustoffe verwendet zu werden. — Dieser Hinweis soll eine mikrochemische Bearbeitung anregen.

Glykogen.

1856 entdeckten Cl. Bernard und Hensen das Glykogen der Leber. 1863 machte de Bary auf den stark lichtbrechenden Inhalt der Asci vieler Pilze aufmerksam und 5 Jahre später wurde Glykogen von Kühne in *Aethalium septicum* nachgewiesen. Reinke und Rodewald¹⁰⁾ traten bereits für die Identität des tierischen und pflanzlichen Glykogens ein. Seit 1882 beschäftigte sich besonders Errera¹¹⁾ mit diesem Körper. Seine zahlreichen Arbeiten wurden von Massart¹²⁾ in letzter Zeit neu herausgegeben. Das isolierte Glykogen ist ein weißes, amorphes, in Wasser leicht lösliches Pulver. Aus der wässrigen Lösung, die opalesziert, wird es durch Barytwasser gefällt. Es reduziert Fehlingsche Lösung nicht und gibt bei der Hydrolyse und bei der Einwirkung von Enzymen (Speichel, Leber,

¹⁾ C. Tanret, Compt. rend., 1893, CXVII, S. 212.

²⁾ O. Schmiedeberg, Ztschr. physiol. Chem., 1879, III, S. 112.

³⁾ A. Riche u. A. Rémont, Journ. pharm. chim., 1880, II, S. 291.

⁴⁾ A. Meyer, Bot. Ztg., 1885, XLIII, S. 490.

⁵⁾ O. Wallach, Ber. d. chem. Ges., 1888, XXI, S. 396.

⁶⁾ Th. Blezinger, Bot. Zentrbl., 1892, LIX, S. 279.

⁷⁾ H. Müller, Arch. d. Pharm., 1872, CCX, S. 132 u. Journ. f. prakt. Chem., 1873, S. 832.

⁸⁾ H. Keller, Über die Kohlenhydrate der Monokotylen, insbes. Irisin, Sinistrin, Triticin, Münster 1894 u. A. Meyer, Wiss. Drogenkunde, II, S. 46.

⁹⁾ A. Fischer, Zelle d. Cyanophyceen, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 51.

¹⁰⁾ Reinke und Rodewald, Studien über das Protoplasma, 1881.

¹¹⁾ Errera, L'Epiplasma des Ascomycètes, Brüssel 1882 und Compt. rend.

¹²⁾ L. Errera, Bibliographie du Glycogène et du Paraglycogène chez les végétaux, Rec. de l'inst. bot. de Bruxelles, 1905, I, S. 382.

Hefezellen) Traubenzucker. Unter den Abbauprodukten des Glykogens finden sich ähnliche Stoffe wie bei der Amylumhydrolyse (Maltose). Die empirische Zusammensetzung ist $C_6H_{10}O_5$ oder $6(C_6H_{10}O_5) + H_2O$ nach Clautriau¹⁾, welcher im getrockneten Pulver von *Boletus edulis* 20%, in *Amanita muscaria* 14%, im Pulver von *Saccharomyces* 31% Glykogen fand.

Glykogen ist ein bei Pilzen, bei niederen Algen (Cyanophyceen), Bakterien und Protozoen weit verbreitetes, die Stärke vertretendes Kohlehydrat. Es kommt in Zellsaftvakuolen vor. Bei Pilzen wird es aufgespeichert und zum Wachstum der Fruchträger und zur Sporenbildung aufgebraucht²⁾. In Sporen wird kein Glykogen gespeichert, wohl aber in Sklerotien. Über seine Wanderung ist noch wenig ermittelt. Bei Cyanophyceen ist es wahrscheinlich das erste nachweisbare Assimilationsprodukt. Auch in der grünen Euglenacee *Colacium vesiculosum* kommt es nach Errera vor, ebenso in Schwefelbakterien (*Thiocystis violacea*, Hinzes Amylin (s. d.) dürfte Glykogen sein). Nach Henneberg³⁾ entsteht es in den Hefezellen weder aus „Eiweiß, noch aus Pepton oder Fett“, Glykogen-vakuolen sollen nicht existieren, „das Glykogen durchsetzt das Eiweiß“.

In den lebenden Zellen bildet das Glykogen eine farblose, stark lichtbrechende Substanz, die sich mit Jodjodkaliumlösung leuchtend rotbraun färbt. Die Intensität der Färbung ist um so stärker, je mehr Glykogen zugegen ist. Bei Anwesenheit von Spuren erhält man nur eine braune, orange oder selbst gelbe Färbung. Man kann, wie L. Errera⁴⁾ zeigte, aus der Intensität der Reaktion auf die Menge des anwesenden Glykogens schließen, doch muß man dann stets die gleiche Jodlösung benutzen (0,1 Jod, 0,3 Jodjodkalium, 45,0 Wasser). Selbstverständlich müssen die Präparate bei derartigen Vergleichsversuchen direkt in das Reagens gelegt werden. Benutzt man stärkere Jodlösungen, dann werden auch Spuren von Glykogen intensiver gefärbt. Hat man auf ein in Jodjodkaliumlösung liegendes Präparat Wasser einwirken lassen und zerdrückt man dann die Zellen, so daß

¹⁾ C. Clautriau, Mém. de l'Acad. royal. de Belgique, 1895, LIII und: Étude chim. du glycogène chez les champignons et les levures, Brüssel, F. Hayez, 1895, u.: Creighton, Microscop. researches of the formative property of glycogen, London 1896.

²⁾ Eine abweichende Angabe macht Ch. Ternetz, die bei *Ascophanus carneus* selbst nach zweimonatlichem Hungern keine Abnahme der äußerst geringen Mengen von Glykogen beobachtete (Protoplasmabewegung und Fruchtkörperbildung bei A. c. Pers., Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 277). Bei diesem Pilze fanden sich Körnchen, die eine Eigenbewegung besitzen, weder Gerbstoff- noch Jodreaktionen geben, aber Kernfarbstoffe speichern.

³⁾ W. Henneberg, Neuere Unters. über Eiweiß-, Glykogen- und Fett-hefezellen, Verh. 83. Nat. Vers. Karlsruhe, 1911, II, 1, S. 240.

⁴⁾ L. Errera, Über den Nachweis des Glykogens bei Pilzen, Bot. Ztg., 1886, XLIV, S. 316 und: Sur le glycogène chez les Basidiomycètes, Mém. de l'Acad. d. Belg., 1885, XXXVII.

die rotbraunen Massen ins Wasser gelangen, so kann man ihr Auflösen im Wasser verfolgen. Mit der Stärke teilt Glykogen die Eigenschaft, daß die Jodfärbung beim Erwärmen verschwindet, um beim Erkalten wieder sichtbar zu werden. Doch muß man, um ein Auflösen zu verhindern, vorsichtig auf 50—60° erwärmen. Bisher ist es noch nicht gelungen, die Jodfärbung des Glykogens (von der es noch fraglich ist, ob sie auf chemischen Vorgängen beruht) haltbar zu machen.

Auf die Gerinnungsfähigkeit des Glykogens hat A. Fischer¹⁾ den sichersten mikrochemischen Nachweis gegründet. Das Material wird in Alkohol fixiert, die Mikrotomschnitte kommen in Xylol, dann in Alkohol und schließlich ohne den anhaftenden Alkohol zu entfernen in eine 10%ige wässerige Tanninlösung. Nachdem die Präparate 10—15 Minuten lang in der Tanninlösung gelegen haben, werden sie zunächst wiederum ohne Abspülung in 1%, dann in eine 10%ige wässerige Lösung von doppelchromsaurem Kali gebracht. Auch hierin bleiben sie etwa 10 Minuten. Auf diese Weise ist das Glykogen gänzlich unlöslich in Wasser geworden. Es kann nun mit basischen Farbstoffen (Safranin, Bismarckbraun, Jodgrün, Methylenblau) gefärbt werden, wird von Safranin leuchtend rot und zeigt die Form, welche es bei der Fixierung mit Alkohol hatte. Zellkerne bleiben hierbei infolge der Tanninbehandlung ungefärbt oder erscheinen durch die Chrombehandlung nur schwach gelblich. Gute Färbungen erhält man mit 10 Minuten langem Färben mit Safranin-Anilinwasser. — Die in der tierischen Histologie benutzten Färbungsmethoden von Vastarini, Best und P. Mayer sind, wie es scheint, auf unserem Gebiete noch nicht erprobt worden. Mayer²⁾ sagt auch, daß das Gallein (Grübler) „unter Zusatz von Ammoniak in 70% Alkohol gelöst, eine sehr präzise Färbung des Glykogens gibt, und zwar ziemlich lebhaft violett“.

Als Hilfsreaktion wird man schließlich Färbungen mit Rutheniumrot heranziehen können, denn Tobler³⁾ fand, daß sich sowohl reines Glykogen (Schuchhardt-Görlitz) als auch Glykogen in verschiedenen Präparaten intensiv mit diesem Farbstoffe färbt.

¹⁾ A. Fischer, Eine neue Glykogenfärbung, *Anatom. Anzeiger*, 1905, XXVI, S. 399.

²⁾ P. Mayer, Zur Färbung des Glykogens, *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, 1909, XXVI, S. 513.

³⁾ F. Tobler, Über die Brauchbarkeit von Mangins Rutheniumrot als Reagens für Pektinstoffe, *Ztschr. f. wiss. Mikr.*, 1906, XXIII, S. 182.