Über die Nachweisung und das Vorkommen von Carotinoiden in der Pflanze.

Von C. van Wisselingh.

Einleitung.

Die schönen gelben und roten Farbstoffe im Pflanzenreich, die unter dem Namen Carotine[1]) oder Carotinoide[2]) zusammengefaßt sind, haben schon lange die Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Schon im Jahre 1831 hat Wackenroder[3]) das Carotin aus der Mohrrübe isoliert und nachher sind viele wichtige chemische, physische und mikroskopische Arbeiten veröffentlicht worden. Viele dieser Arbeiten zeugen von großer Sorgfalt und Originalität. Besonders haben Arnaud[4]) und während der letzten Zeit Willstätter und seine Schüler[5]) wichtige chemische Untersuchungen ausgeführt. Stokes[6]) hat eine physische Methode, die sogenannte Entmischungsmethode, zuerst beim Studium der Carotinoide angewendet. Später hat auch Tswett[7]) eine vernünftige physische

---

1) F. Czapek, Biochemie der Pflanzen, 1. Aufl., Bd. I, pag. 172, 2. Aufl., Bd. I, pag. 803.

2) M. Tswett, Über den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. Ber. d. Deutsch. bot. Ges., 29. Jahrg., 1911, Heft 9, pag. 630.

3) Geiger's Mag. f. Pharm. 1831, 33, pag. 144.

4) A. Arnaud, Recherches sur la composition de la carotine, sa fonction chimique et sa formule. Comptes rendus 1886, CII, 1, pag. 1119.

5) R. Willstätter, Untersuchungen über Chlorophyll, IV. Richard Willstätter und Walter Mieg, Über die gelben Begleiter des Chlorophylls. Justus Liebig's Annalen der Chemie 1907, Bd. CCCLV, pag. 1. Richard Willstätter und Heinr. H. Escher, Über den Farbstoff der Tomate. Hoppe-Seyler's Zeitschr. für physiol. Chemie 1910, Bd. LXIV, pag. 47.

Richard Willstätter und Arthur Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll usw. 1913, pag. 247; Gewinnung und Beschreibung des Fucoxanthins von R. Willstätter und H. J. Page.

6) G. G. Stokes, Proc. Roy. Soc. 13, 144 (1864).

7) M. Tswett, Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 1906, 24. Jahrg., pag. 316. Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls, l. c. pag. 384.

Methode ausgefunden, wobei Adsorptionsvorgänge eine Rolle spielen und welche er chromatographische Methode genannt hat. Molisch[1]) hat eine eigentümliche neue mikrochemische Methode ausgefunden. Zopf[2]) verdanken wir bedeutende Beiträge über Carotinoide bei niederen Organismen, und viele andere Forscher, unter anderen Zeise[3]), Immendorff[4]), Kraus[5]), Sorby[6]), Borodin[7]), Monteverde[8]) und Tschirch[9]) haben im Verlauf der Zeit auf die eine oder die andere Weise unsere Kenntnis der Carotinoide sehr ausgedehnt. Ihre Entwicklung ist in Rücksicht auf andere Probleme eine ziemlich gleichmäßige gewesen. Jedoch haben, wie man von einem Gegenstande, dessen Studium große Schwierigkeiten macht, erwarten kann, nicht alle Untersuchungen zu übereinstimmenden Resultaten geführt. Besonders die Resultate der mikroskopischen Untersuchungen sind sehr verschieden und zum Teil sehr in Widerspruch mit denen, welche man auf chemischem und physischem Wege erzielt hat.

Man kann die Forscher in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe erklärt alle Carotinoide für identisch; sie behauptet, daß die Unterschiede, die man beobachtet, nicht von chemischer Natur sind. Die andere Gruppe, der die meisten Forscher angehören, nimmt mehrere Carotinoide an, die chemisch verschieden sind. Eine Vertreterin der ersten Gruppe

---

1) Hans Molisch, Die Kristallisation und der Nachweis des Xanthophylls (Carotins) im Blatte. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 1896, Bd. XIV, pag. 19.

2) W. Zopf, Zur Kenntnis der Färbungsursachen niederer Organismen. Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen, erstes Heft, 1892, pag. 30; zweites Heft, 1892, pag. 3; drittes Heft, 1893, pag. 26. Cohn's Hämatochrom ein Sammelbegriff. Biolog. Zentralbl. 1895, Bd. XV, pag. 417. Über das Polycystin usw. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 1900, 18. Jahrg., Bd. XVIII, pag. 461.

3) W. C. Zeise, Journ. prakt. Chem. (1847), Bd. XL, pag. 297. Lieb. Ann. (1847), Bd. LXII, pag. 380.

4) H. Immendorff, Das Carotin im Pflanzenkörper usw. Landw. Jahrb. 1889, Bd. XVIII, pag. 507.

5) G. Kraus, Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe und ihrer Verwandten. Spektralanalytische Untersuchungen, 1872.

6) H. C. Sorby, Quart. Journ. of Micr. Science (1871), 11, 215. Quart. Journ. of Science (1871), 8, 64. Proc. Roy. Soc. (1873), 21, 442.

7) J. Borodin, Über kristallinische Nebenpigmente des Chlorophylls. Mélanges biologiques tirés du Bull. de l'Acad. imp. d. sc. de St. Pétersbourg 1883, T. XI, pag. 485 (Bull., T. XXVIII, pag. 328).

8) N. A. Monteverde, Acta Horti Petropolitani 1893, XIII, Nr. 9.

9) A. Tschirch, Das Quarzspektrograph und einige damit vorgenommene Untersuchungen. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 1896, Bd. XIV, pag. 76. Spektralanalytische Untersuchungen mit Hilfe des Quarzspektrographen, l. c. 1904, Bd. XXII, pag. 414.

ist besonders T. Tammes[1]). Sie gelangte nach Untersuchung einer ziemlich großen Anzahl von Pflanzen zu dem Resultate, daß der gelbe bis rote Plastidenfarbstoff in grünen, gelbbunten, etiolierten und herbstlich vergilbten Blättern, Blüten, Früchten, Samen, Diatomaceen, Grünalgen, Blaualgen, Braunalgen und Rotalgen in chemischen und physischen Eigenschaften mit dem Carotin aus der Wurzel von Daucus Carota völlig übereinstimmt.

Die letzten makrochemischen Untersuchungen über Carotinoide, nämlich die von Willstätter und seinen Schülern, haben die Resultate von Tammes nicht bestätigt. Willstätter und Mieg[2]) isolierten aus den Blättern der Brennessel zwei Carotinoide, nämlich Carotin ($C_{40}H_{56}$), welcher Stoff sich identisch zeigte mit dem Carotin aus der Wurzel von Daucus Carota und Xanthophyll ($C_{40}H_{56}O_2$), während Willstätter und Escher[3]) aus der Tomate ein anderes Carotinoid, Lycopin, isomer mit dem Daucus-Carotin isolierten. Aus zwei Objekten erhielten sie deshalb drei Carotinoide, zwei sauerstofffreie (Kohlenwasserstoffe) und einen sauerstoffhaltigen Körper.

Der große Unterschied zwischen den Resultaten der mikroskopischen und makrochemischen Untersuchungen entschloß mich, die verschiedenen Methoden zu prüfen, die man für die Nachweisung der Carotinoide auf mikroskopischem Wege empfohlen hat.

Einige Forscher unterscheiden direkte und indirekte Methoden. Die direkten gründen sich auf die Hinzufügung von Reagenzien, die Färbungen hervorrufen, wie z. B. die schöne Färbung mit Schwefelsäure und die indirekten auf die Auskristallisierung der Carotinoide in den Zellen und Geweben. Die Carotinoide kommen nämlich nur in einzelnen Fällen als Kristalle in den Zellen vor; meist sind sie an flüssigen, fettartigen, von Alkalien verseifbaren Substanzen gebunden oder eigentlich in denselben aufgelöst[4]). Diese Substanzen befinden sich in den Plastiden oder sie bilden, wie es besonders bei niederen Organismen der Fall ist, ölartige Tropfen in den Zellen[5]). Die indirekten Methoden haben den Zweck, die Carotinoide in Freiheit zu setzen und zur Kristallisation zu bringen.

---

1) T. Tammes, Über die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreiche. Flora 1900, 87. Bd., 2. Heft, pag. 244.

2) l. c.

3) l. c.

4) Siehe F. G. Kohl, Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Bedeutung in der Pflanze 1902, pag. 118ff.

5) Siehe W. Zopf, Zur Kenntnis der Färbungsursachen niederer Organismen usw. 1892, 1. Heft, pag. 35 und 1892, 2. Heft, pag. 5.

Bei der Beschreibung meiner Resultate muß ich natürlich auch die Farbe der ausgeschiedenen Kristalle und die durch Reagenzien hervorgerufene bezeichnen. Ich bemerke, daß die von mir benutzten Namen der Farben mit denen von Klincksieck et Valette, Code des Couleurs, 1908, in Übereinstimmung sind. Oft habe ich auch die Nummern, welche den Farben in diesem Leitfaden gegeben sind, erwähnt.

Ausscheidung der Carotinoide in Form von Kristallen.

Die indirekten Methoden eignen sich für die mikroskopische und mikrochemische Untersuchung der Carotinoide. Wenn man diese Körper in Form von Kristallen ausgeschieden hat, kann man sie mit Reagenzien und Lösungsmitteln untersuchen. Jedoch für das Studium der Lokalisation sind die indirekten Methoden minder geeignet. Die Plastiden, in denen sie sich finden, werden destruiert und die Ansetzung von Kristallen findet nicht immer in den Zellen statt, in welchen die Carotinoide in den lebenden Objekten vorkommen. Bisweilen wandern sie, bevor sie auskristallisieren, und an anscheinend willkürlichen Stellen können dann bisweilen große Kristallaggregate entstehen. Beim Studium der Lokalisation muß man darum die Reagenzien auch direkt auf die Präparate einwirken lassen.

Kalimethode.

Die von Molisch[1]) gefundene Kalimethode war ursprünglich für die Nachweisung von Xanthophyll oder Carotin in grünen Blättern bestimmt. Die frischen Blätter oder Teile derselben legt man in alkoholische Kalilauge, die 40 Volumenprozente Alkohol und 20 Gewichtsprozente Kaliumhydroxyd enthält; sie werden darin mehrere Tage unter Abschluß von Licht gelassen, bis alles Chlorophyll ausgezogen ist. Bei grünen Blättern gibt die Kalimethode gute Resultate, aber auch bei vielen anderen Objekten ist das der Fall, nämlich bei etiolierten Blättern, Herbstblättern, bunten Blättern, Blüten, Früchten, Algen usw. In den meisten Fällen führt die Methode zu positiven Resultaten; nur in einigen Fällen findet keine Auskristallisation statt.

Um mir eine Vorstellung zu machen, auf welche Weise die Kristallbildung stattfindet, habe ich in einigen Fällen die Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes auf die lebenden Objekte unter dem Mikroskop studiert. Mit ein paar Beispielen will ich die Kristallbildung erläutern.

---

1) l. c.

In der Blumenkrone von Calceolaria rugosa kommen große, gelbe Plastiden vor. Das Carotinoid befindet sich in gelöstem Zustande in einem flüssigen, leicht verseifbaren Stoff, der in den Plastiden eine gelbe, peripherische Schicht bildet. Nach Hinzufügung des Molisch'schen Reagenzes bilden die Plastiden bisweilen gelbe Kugeln mit scharfem Kontur, die sich bald in Kugeln und Massen verwandeln, die einen minder scharfen Kontur zeigen und Verseifungsprodukte sind. Oft geht die Verseifung noch schneller vor sich, so daß man keine Kugeln mit scharfem Kontur beobachtet, sondern sofort die Verseifungsprodukte. Diese lösen sich und schon nach einigen Minuten scheiden sich aus der entstandenen Lösung orangegelbe, nadelförmige oder schmale bandförmige Kristalle aus, die oft sehr lang und stark gebogen und bisweilen gespalten sind.

In den zungenförmigen Blüten von Gazania splendens kommen große, orangefarbige Plastiden vor, in welchen man Kügelchen beobachtet, die in fortdauernder Bewegung sind. Nach Hinzufügung des Molisch'schen Reagenzes bilden sich bald orangefarbene Kugeln mit scharfem Kontur. Diese entstehen durch Zusammenfließung der obengenannten Kügelchen. Die Erscheinung ist nicht die Folge einer Verseifung, wie Kohl[1]) annimmt; denn Erwärmung im Wasser oder Aufenthalt in verdünntem Spiritus (von 70%) hat dieselbe Wirkung. Nach meiner Meinung wird diese Erscheinung dadurch verursacht, daß die Zellen getötet werden und die Plastiden ihre Struktur verlieren. Die Verseifung der entstandenen Kugeln geht bei Gazania splendens sehr langsam vor sich. Nach einem Aufenthalt von 20 Tagen in dem Molischschen Reagens (in vitro) sah ich in den Zellen nur orangefarbene Kugeln, welche von konzentrierter Schwefelsäure dunkelblau gefärbt wurden. Als ich nach 24 Tagen die Blüte wieder untersuchte, traf ich wieder viele orangefarbene Kugeln an, aber daneben auch viele gut gebildete Kristalle, orangene Kristallplättchen mit abgerundeten Enden und Aggregate solcher Kristallplättchen. Die Kristalle geben mit Reagenzien die Farbenreaktionen der Carotinoide und das ist auch mit den orangenen Kugeln der Fall, was beweist, daß noch nicht alles Carotinoid auskristallisiert ist.

Die Bildung von Kristallen in der Blüte von Calceolaria und in vielen anderen Objekten bei Anwendung des Molisch'schen Reagenzes kann man auf die folgende Weise erklären: Die Carotinoide kommen in der lebendigen Pflanze in gelöstem Zustande vor. Sie sind in einer flüssigen, fettartigen Substanz gelöst. Durch Hinzufügung des Molisch-

1) l. c. pag. 122.

schen Reagenzes werden die Plastiden destruiert und die flüssige Substanz bildet dann Kugeln, die durch das Carotinoid orangegelb oder orange gefärbt sind. Darauf wirkt das Molisch'sche Reagens verseifend und auflösend. Der ölige Stoff wird verseift und die Zellen füllen sich mit einer Lösung des Verseifungsproduktes, worin das Carotinoid löslich ist. Diese Lösung wird durch das Reagens, in dem die Objekte sich befinden, verdünnt, und die Carotinoide, die in dem Molisch'schen Reagens unlöslich sind, kristallisieren aus.

Auf Grund des eben erwähnten, hatte ich die Vermutung, daß die Carotinoide in einer starken Seifenlösung löslich sind. Es zeigte sich, daß dieses der Fall war. Als ich z. B. die Präparate mit Carotinoidkristallen mit Wasser auswusch und in Seifenspiritus (Spiritus saponatus, Pharm. Nederl., Ed. IV, ohne Lavendelöl) legte, so lösten die Kristalle sich allmählich auf.

Es versteht sich, daß, wenn die Verseifung sehr langsam weiter vor sich geht, man die Kristallbildung unter dem Mikroskop nicht beobachten kann. Wenn man in diesem Falle die Präparate nach und nach untersucht, erhält man den Eindruck, daß je nachdem die aus den Plastiden entstandenen Kugeln und Massen sich lösen, die Kristalle aus denselben hervorschießen.

Wie aus den beiden obenerwähnten Beispielen hervorgeht, findet die Verseifung der fettartigen Substanz und die Ausscheidung der Kristalle entweder schnell oder sehr langsam statt. Nach der Natur der Objekte braucht es für die Ausscheidung von Kristallen Minuten, Stunden, Tage, Wochen oder Monate. Zu den Objekten, bei denen die Geduld eines Menschen sehr lange auf die Probe gestellt wird, gehören außer den zungenförmigen Blüten von Gazania splendens auch die zungenförmigen Blüten von Hiëracium aurantiacum, Doronicum Pardalianches und Taraxacum officinale, bei denen ich resp. nach 24, 48 und 74 Tage Kristalle beobachtete. Bei den zungenförmigen Blüten von Hiëracium murorum und Inula Helenium und bei den Blumenblättern von Viola cornuta konnte ich resp. nach 130, 110 und 30 Tagen noch keine Kristalle wahrnehmen. Daß in diesen letzten Fällen das Carotinoid nicht auskristallisiert ist, kommt dadurch, daß die ölartige Substanz nicht verseift wird und das Carotinoid in Lösung hält. Die gelben oder orangegelben Kugeln, die man in den Zellen antrifft, färben sich mit konzentrierter Schwefelsäure blau, mit Jodjodkaliumlösung grün und mit Bromwasser vorübergehend blau, was beweist, daß sie das Carotinoid enthalten.

Ich glaube nicht, daß eine lange dauernde Einwirkung des Molischschen Reagenzes schadet. Ich habe keinen Anhaltspunkt, daß die Caro-

tinoide sich dabei zersetzen, und zuletzt bekommt man noch oft schöne Ausscheidungen von Kristallen. In gut 80 Fällen, nämlich bei Blüten, Blättern, Früchten und Algen, mit Carotinoiden, habe ich die Molisch-sche Kalimethode geprüft und nur in den drei obengenannten Fällen kam es nicht zur Auskristallisation der Carotinoide.

Es versteht sich, daß das Warten auf die Kristallbildung nicht angenehm ist und deshalb habe ich die Kalimethode etwas modifiziert. Die Modifikation besteht darin, daß man das Molisch'sche Reagens nicht bei der gewöhnlichen Temperatur einwirken läßt, sondern die Einwirkung durch Erwärmung unterstützt. Meist erwärmte ich die Präparate einige Tage hintereinander, täglich während einiger Stunden auf 70—80° C. Ich habe die Modifikation bei einigen Objekten geprüft, unter anderen bei der Blüte von Taraxacum officinale, mit welcher ich kein Resultat erzielte. Mit anderen Objekten erhielt ich aber überraschende Resultate, unter anderen, mit der Blüte von Kleinia Galpini und mit den Früchten von Sorbus aucuparia, Capsicum annuum, Physalis Francheti und Viburnum Opulus. Nach 10tägiger Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes bei gewöhnlicher Temperatur zeigte es sich, daß bei Kleinia Galpini die Plastiden zu orangefarbigen Kugeln und Massen zusammengeflossen waren; Kristalle waren jedoch nicht wahrnehmbar. Unterstützte ich die Einwirkung des Reagenzes durch Erwärmung, so waren in derselben Zeit alle Kugeln aus den Zellen verschwunden und anstatt derer, fand ich zahlreiche orangegelbe (Kl. et V. 151), lange, rechte oder gebogene, flache Nadeln oder lange, schmale Plättchen.

Bei der Frucht von Sorbus aucuparia konnte ich auch feststellen, daß Erwärmung die Verseifung und Kristallbildung beschleunigt. Bei diesem Objekt zeigen sich aber zwischen Einwirkung bei der gewöhnlichen Temperatur und Einwirkung unter Erwärmung noch andere Unterschiede, die ich später besprechen werde.

In den Zellen der Fruchtwand von Capsicum annuum findet man nach einer Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes während zweier Monate bei der gewöhnlichen Temperatur viele orangefarbige Kugeln, aber von einer kristallinischen Ausscheidung kann man nur wenig bemerken. Wenn die Einwirkung einige Tage durch Erwärmung unterstützt wird, sind die orangefarbigen Kugeln verschwunden, und beobachtet man in den Zellen Kristallaggregate und einzelne Kristalle verschiedener Form und Farbe; man sieht rote (Kl. et V. 16, 21), orangerote (76, 81) und orangefarbige (106, 127) Kristalle.

Behandelt man die Frucht und den Kelch von Physalis Francheti mit dem Molisch'schen Reagens bei der gewöhnlichen Temperatur,

so ist nach 40 Tagen nur wenig Carotinoid auskristallisiert. Die orangefarbigen Plastiden scheinen noch wenig verändert. Nach 1 Jahr 2½ Monat sieht man wohl mehr Kristalle zwischen den Plastiden, die im allgemeinen noch ihre Form beibehalten haben, aber offenbar ist das meiste Carotinoid noch nicht auskristallisiert. Erwärmt man dagegen die Frucht und den Kelch im Molisch'schen Reagens, so schmelzen die Plastiden bald zu orangefarbenen Kugeln zusammen. Nach einigen Tagen sind die Kugeln aus den Zellen ganz verschwunden und statt derer findet man eine Menge orangegelbe (Kl. et V. 151), meist schmale, bisweilen gebogene Kristallplättchen, welche oft nadelförmig erscheinen.

In der Frucht von Viburnum Opulus entstehen durch Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens bei der gewöhnlichen Temperatur bald orangefarbige Kugeln. Nach 7 Wochen scheinen die Kugeln noch nicht geändert und ist noch kein Carotinoid auskristallisiert. Wird die Einwirkung auf die obenerwähnte Weise durch Erwärmung unterstützt, so werden die Kugeln allmählich zersetzt. In den Zellen entstehen viele farblose Kristalle und in den Kugeln rote tafelförmige Kristalle von Carotinoid. Sie ragen allmählich aus den Kugeln hervor und werden zuletzt frei. Bei Viburnum Opulus muß der Versuch mehrere Wochen fortgesetzt werden.

Nach Tammes[1]) und Kohl[2]) bestehen alle gelb bis rot gefärbte Kristalle, die man mit Hilfe der Kalimethode erhält, wie verschieden Farbe und Form auch sind, aus Carotin. Nach ihnen würde die Farbe der Kristalle nur von ihrer Dicke und von dem Winkel, unter dem man sie beobachtet, abhängig sein. Becke[3]) nimmt aber auf Grund kristallographischer Untersuchungen an, daß die verschiedenen Kristalle, welche man nach der Methode von Molisch bekommt, nicht identisch sind. Ich selbst bin zu den folgenden Resultaten gekommen.

In vielen Fällen ist die Farbe und die Form der Kristalle sehr verschieden. Was die Farbe betrifft, kann man sie in zwei Gruppen einteilen, nämlich eine Gruppe, welche die orangerote (Kl. et V. 61, 66, 76, 81, 91), rote (Kl. et V. 21, 22, 46) und violettrote (Kl. et V. 576, 586) umfaßt und eine andere Gruppe, welche die gelbe (Kl. et V. 201), orangegelbe (Kl. et V. 126, 151, 176) und orangene (Kl. et V. 101, 102, 106) zusammenfaßt. Die Intensität und auch einigermaßen die Nuance

1) l. c. pag. 242 und 244.
2) l. c. pag. 33ff. und 67.
3) Hans Molisch, l. c. pag. 24.

der Farbe ist mehr oder weniger abhängig von der Dicke der Kristalle. In der ersten Gruppe kommt immer rot vor, in der zweiten nicht.

Wie verschieden die Form der Kristalle auch ist, kann man doch konstatieren, daß Form und Farbe einigermaßen zusammenhängen. Unter den roten oder orangeroten Kristallen findet man gewöhnlich gut entwickelte Tafeln, welche die Form von kleinen Parallelogrammen und bisweilen von kleinen Rhomben haben. Die Länge der Plättchen ist gewöhnlich um einige Male länger als die Breite; bisweilen sind sie noch schmäler und spitzen Nädelchen ähnlich. Die Parallelogramme und Rhomben sind oft unvollkommen. Teile fehlen oft; die Ecken und Seiten sind manchmal abgerundet. Die roten Kristalle bilden oft Aggregate.

Die orangegelben und orangenen Kristalle sind auch sehr verschieden. Oft trifft man Plättchen an, die um einige Male länger als breit sind. Selten sind die Plättchen ebenso lang wie breit. Die Kristalle laufen meist abgerundet aus, selten spitz oder sie bilden unregelmäßige oder gerade Breiteseiten. Oft findet man ovale oder wetzsteinförmige Plättchen. Selten trifft man Rhomben mit abgerundeten Ecken an. Bald sind die Plättchen verhältnismäßig groß und haben keine bestimmte Form, bald sind sie schmal und lang und etwas gebogen. Dieser letzteren Form reihen sich die oft vorkommenden band- und nadelförmigen Kristalle an. Diese sind meist stark gebogen; gerade Nadeln kommen nicht häufig vor. Die bandförmigen Kristalle sind oft verzweigt oder in einzelne gebogene Nadeln gespalten. Den gebogenen, nadelförmigen Kristallen reihen sich schließlich die fadenförmigen an, die oft stark gewunden sind und manchmal Knäuel bilden. Die tafelförmigen Kristalle sind oft zu Aggregaten vereinigt.

In den meisten Objekten, in vielen Blüten, Blättern, Früchten und Algen scheiden sich zweierlei Kristalle aus, rote oder orangerote und orangegelbe oder orangene Kristalle. Bei chlorophyllhaltigen Objekten, wie Blätter und Algen, ist das die Regel. Oft trifft man in diesen Objekten Kristallaggregate an, die aus beiderlei Kristallen zusammengesetzt sind.

Bisweilen kommen verschiedene Kristalle der Gruppe der gelben, orangegelben und orangefarbigen in demselben Objekt vor. In der Blumenkrone von Cucurbita melanosperma z. B. scheiden sich orangene (Kl. et V. 126) Kristalle aus, welche gewundene fadenförmige und ziemlich dicke, meist gerade, flache Nadeln sind. Letztere finden sich besonders in den Haren. In der Blüte von Dendrobium thyrsiflorum bilden sich orangegelbe (Kl. et V. 151), wetzsteinförmige Plättchen und orangegelbe

(151), fadenförmige Kristalle und lebhaft orangene (101), einigermaßen orangerot (81) gefärbte Aggregate von feinen nadelförmigen Kristallen. In der Blüte von Tulipa Gesneriana fand ich orangegelbe (151) Kristallaggregate und gelbe (201) kristallinische Ausscheidungen.

Wie große Verschiedenheit die Kristalle auch zeigen, gibt es einen wichtigen Unterschied zwischen den roten und orangeroten einerseits und den orangegelben und orangenen Kristallen andererseits. Wenn die Carotinoide sich nämlich in der Form von Plättchen ausscheiden, findet man unter den roten sehr häufig gut gebildete Parallelogramme, während derartige Kristalle unter den orangegelben und orangenen nie vorkommen.

Verschiedene Umstände, wie die Quantität des Molisch'schen Reagenzes, die Dauer der Einwirkung und die Jahreszeit haben Einfluß auf die Resultate. Mit einigen Beispielen werde ich das erläutern.

In den Blumenblättern von Chelidonium majus bildeten sich fadenförmige Kristalle, wenn ich sie in eine kleine Flasche mit einer großen Quantität des Molisch'schen Reagenzes brachte, dagegen entstanden Plättchen, wenn ich ein Blumenblatt in ein wenig Molisch'schem Reagens zwischen Objektträger und Deckglas deponierte.

Bei den Blättern von Urtica dioica konnte ich konstatieren, daß die Quantität des Reagenzes nicht nur Einfluß auf die Form der Kristalle, sondern auch auf die Stelle der Ausscheidung ausübte. Bei Anwendung von viel Molisch'schem Reagens bildete sich in jeder Zelle ein kleines Aggregat von orangegelben und roten Kristallen; mit wenig Molischschem Reagens erhielt ich an verschiedenen Stellen im Gewebe große rote und orangegelbe Kristallaggregate, sowie auch außerhalb desselben. Dieses Resultat braucht uns nicht zu wundern, denn die Carotinoide sind in der Lösung der entstandenen Verseifungsprodukte löslich und nicht in dem Molisch'schen Reagens. Wenn man wenig Molisch'sches Reagens anwendet, findet nicht bald Verdünnung der Seifenlösung statt und die Carotinoide haben Gelegenheit, im Gewebe zu wandern. Im allgemeinen ist es deshalb nicht erwünscht, wenig Molisch'sches Reagens zu gebrauchen, es sei denn, daß man sich aus dem einen oder anderen Grund große Kristalle wünscht.

Ein lange dauernder Aufenthalt in dem Molisch'schen Reagens kann selbst, wenn schon das Carotinoid auskristallisiert ist, noch Wanderung desselben veranlassen. Ich konnte das beispielsweise bei Zygnema cruciatum feststellen. Das Molisch'sche Reagens verursachte in diesem Objekt bald in allen Zellen eine reichliche Ausscheidung kleiner orangegelber Kristalle. Als ich nach 9 Monaten das Material wieder untersuchte,

sah ich nur in einigen Zellen orangegelbe Kristalle, nämlich sehr große Aggregate; in den übrigen Zellen konnte ich nur einzelne rote Plättchen beobachten, aber gar keine orangegelben Kristalle.

Auf Grund der Untersuchungen von Arnaud[1]) darf man annehmen, daß die Resultate in verschiedenen Jahreszeiten verschieden sein können. Arnaud fand z. B. in den Blättern der Kastanie und der Brennessel die Quantität des Carotins im Mai während der Blütezeit am größten. Ich fand, daß die Kristallausscheidung in anderen Fällen auch nicht immer dieselbe war. Besonders war das bei Cladophora conglomerata der Fall, bei welcher Alge bald viel orangegelbe und wenig rote, bald viel rote und wenig orangegelbe Kristalle sich ausschieden.

Nach einigen Forschern kommen die Carotinoide in vielen Fällen schon in der Form von Kristallen in den lebendigen Pflanzen vor. Schimper[2]) und Courchet[3]) haben ausführlich eine Anzahl Objekte beschrieben, wobei das der Fall war. Einige dieser Objekte sind jetzt auch von mir untersucht worden, nämlich die Wurzel von Daucus Carota, die Früchte von Solanum Lycopersicum, Solanum Dulcamara und Tamus communis und die Blüte von Narcissus poeticus.

In der Wurzel von Daucus Carota fand ich rote (Kl. et V. 16) Körperchen von verschiedener Form. Neben gut gebildeten Parallelogrammen kommen unter anderen auch Körperchen vor, welche Röhrchen und korkzieherförmigen Bändern ähnlich sind. In den Röhrchen konnte ich oft Körnchen wahrnehmen. In der Frucht von Solanum Lycopersicum kommen oft sehr lange, rotviolette (Kl. et V. 586) Gebilde vor, die bei genauer Betrachtung sich hohl zeigen und deshalb auch Röhrchen sind. In den Früchten von Tamus communis und Aglaonema commutatum fand ich auch röhrenförmige Gebilde. Ich bemerke, daß nur in den lebendigen Pflanzen derartige Gebilde zur Entwicklung kommen können. Kristalle von Carotinoiden, die man mit Hilfe der Molisch'schen Methode bekommt, sind niemals röhrenförmig.

In der Frucht von Solanum Dulcamara fand ich Plastiden, welche rotviolette Körper enthielten, die teils Körnchen, teils kristallinischen Ausscheidungen ähnlich waren. In den Blüten von Narcissus poeticus

---

1) A. Arnaud, Recherches sur la carotine; son rôle physiol. probable dans la feuille. Compt. rend. 1889, T. CIX, 2, pag. 911.

2) A. W. F. Schimper, Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. Jahrb. für wissensch. Botanik 1885, Bd. XVI, pag. 96 und 122ff.

3) M. Courchet, Recherches sur les chromoleucites. Ann. des sciences natur. 7e sér. Botanique, pag. 293ff.

und einer Varietät von Narcissus Pseudonarcissus beobachtete ich gut gebildete rote oder orangerote Parallelogramme. In der Frucht von Sorbus aucuparia kommen nach Schimper[1]) Plastiden mit aus Nadeln zusammengesetzten Kristallaggregaten vor. Selbst konnte ich aber bei diesem Objekte in den Plastiden keine Kristalle oder Kristallaggregate wahrnehmen.

Die Carotinoide sind nicht die einzigen Farbstoffe, welche Blüten, Früchten und anderen Pflanzenteilen eine schöne, rote bis gelbe Farbe geben. Es kommt vor, daß nebst Carotinoid auch anderer in Wasser löslicher Farbstoff vorhanden ist. Durch Kochen mit Wasser kann man letzteren den Blüten und Früchten entziehen. Die Anwesenheit solcher Farbstoffe verursacht auch, daß das Molisch'sche Reagens in Berührung mit den Objekten oft eine gelbe, orange oder rote Farbe annimmt.

In einigen Fällen danken die Blüten überhaupt nicht den Carotinoiden ihre Farbe, sondern anderen Farbstoffen, so ist es z. B. bei Papaver cambricum. Ich untersuchte zwei Varietäten dieser Pflanzen, die eine mit gelben und die andere mit orangenen Blüten. In beiden fand ich gefärbten Zellsaft, nämlich gelben und orangegelben. Der Farbstoff ging in kochendes Wasser über und färbte dieses schwach orange. Fügt man darauf dem Wasser verdünnte Salzsäure hinzu, so färbt es sich intensiv orangegelb (Kl. et V. 161) oder orange (136). Nimmt man Kalilauge, so ist die Färbung eine intensiv gelbe (201). Der lösliche Farbstoff bewirkt eine intensive Gelbfärbung des Molisch'schen Reagenzes. Wäscht man die Blumenblätter darauf mit Wasser aus, so werden sie vollkommen farblos. Nur an der Basis, wo etwas Chlorophyll vorkommt, sind sie etwas orangegelb und hat sich etwas Carotinoid in orangegelben (151) Kristallchen ausgeschieden.

Nach Kohl[2]) gibt es viele Blüten und andere Objekte, in welchen gelbe und andere in Wasser lösliche Farbstoffe vorkommen.

Während die Carotinoide bei chlorophyllhaltigen Pflanzen, sowohl bei höheren in den Blüten, Blättern, Früchten und anderen Organen wie auch bei niederen, selbst bei Algen, welche auf der untersten Entwicklungsstufe stehen, allgemein vorkommen, so ist dieses bei Fungi verhältnismäßig nur selten der Fall. Doch sind auch schon bei Fungi in vielen Fällen Carotinoide entdeckt worden. Zopf[3]), der sich zu der Untersuchung von Carotinoiden bei niederen Organismen besonderen

1) l. c. p. 127.
2) l. c. pag. 142ff.
3) l. c.

Verdienst erworben hat, fand diese Farbstoffe nicht nur bei Algen, sondern auch bei mehreren niederen und höheren Fungi und bei einigen Bakterien.

Von mir sind jetzt gut 30 Fungi untersucht worden, die sich durch eine gelbe, orange, rote oder andere Farbe unterscheiden. Unter den untersuchten Spezies befanden sich einige, in welchen deutlich Carotinoide nachweisbar waren, nämlich drei Spezies von Calocera, Dacryomyces stillatus, Nectria cinnabarina, Torula rubra, Monilia sitophila und Sphaerostilbe coccophile.

Was die Untersuchung von sehr kleinen Objekten, wie niedere Algen und Fungi betrifft, bemerke ich, daß man notwendig dafür Reinkulturen gebrauchen muß. Wie oben erwähnt, können die Carotinoide während der Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes wandern, was die Resultate, wenn man keine Reinkulturen benutzt, sehr ungewiß machen würde.

Reinkulturen von Fungi erhielt ich aus dem phytopathologischen Institut in Amsterdam und Reinkulturen von Algen aus dem bakteriologischen Laboratorium der technischen Hochschule in Delft. In der nachfolgenden Tabelle bezeichnet ein Sternchen vor dem Namen der Spezies, daß ich für die Untersuchung eine Reinkultur benutzte.

Die Kalimethode von Molisch habe ich bei den folgenden Objekten geprüft:

Blüten:

Asclepias curassavica L.
Calceolaria rugosa Hook.
Calendula arvensis L.
Chelidonium majus L.
Chrysanthemum frutescens L.
Clivia miniata Regel
Corydalis lutea DC.
Cucurbita melanosperma A. Br.
Cytisus Laburnum L.
Cytisus sagittalis Koch (Genista sagittalis L.)
Dendrobium thyrsiflorum Rchb. fil.
Doronicum Pardalianches L.
Doronicum plantagineum L. excelsum.
Eranthis hyemalis Salisb.
Erysimum Perofskianum Fisch. et Mey.
Ferula sp.
Fritillaria imperialis L.
Gazania splendens Hort.
Gongora galeata Reichb.
Hemerocallis Middendorffii Trautv. et Mey.
Hiëracium aurantiacum L.
Hiëracium murorum L.
Inula Helenium L.
Iris Pseudacorus L.
Isatis tinctoria L.
Kerria japonica DC.
Kleinia Galpini
Lilium croceum Chaix

Meconopsis cambrica Vig.
Narcissus poeticus L.
Narcissus Pseudonarcissus L.
Nuphar luteum Sm.
Sinapis alba L.
Spartium junceum L.
Taraxacum officinale Wigg.
Thermopsis lanceolata R. Br.
Trollius caucasicus Stev.
Tulipa Gesneriana L.
Tulipa hortensis Gaertn.
Viola cornuta L. var. Daldowie Yellow.

Grüne Blätter:

Aglaonema commutatum Schott.
Calceolaria rugosa Hook.
Chelidonium majus L.
Chrysanthemum frutescens L.
Cucurbita melanosperma A. Br.
Dendrobium thyrsiflorum Rchb. fil.
Elodea canadensis Michx.
Erysimum Perofskianum Fisch. et Mey.
Narcissus Pseudonarcissus L.
Selaginella Kraussiana A. Br.
Taraxacum officinale Wigg.
Triticum repens L.
Tulipa Gesneriana L.
Urtica dioica L.

Gelbbunte Blätter:

Croton ovalifolius Vahl.
Graptophyllum pictum Griff.
Sambucus nigra L. fol. var.

Früchte:

Aglaonema commutatum Schott.
Capsicum annuum L.
Physalis Francheti
Rosa rugosa Thunb.
Solanum Dulcamara L.
Solanum Lycopersicum Trn.
Sorbus Aria Crantz
Sorbus aucuparia L.
Tamus communis L.
Viburnum Opulus L.

Arilli:

Evonymus latifolius Mill.
Taxus baccata L.

Wurzel:

Daucus Carota L.

Algen:

*Anabaena sp.
Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol.
Ceramium rubrum (Huds.) Ag.
*Chlorella protothecoides
*Chlorella variegata
Chondrus crispus (L.) Stackh.
Cladophora conglomerata
*Cystococcus humicola

Euglena sp.
Fucus serratus L.
Fucus vesiculosus L.
*Haematococcus pluvialis Flot.
Laminaria digitata (L.) Lam.
Laminaria saccharina (L.) Lam.
Nodularia sp.
*Nostoc sp. aus Peltigera canina
Nitella sp.
Oedogonium sp.
*Pleurococcus vulgaris
Spirogyra maxima (Hass.) Wittr.
*Stichococcus majus
Zygnema cruciatum (Vauch.) Ag.

Fungi:

*Acrostalagmus cinnabarinus Corda
*Amblyosporium albo-luteum Cost.
*Aspergillus giganteus Wehmer
*Bulgaria inquinans Fr.
Calocera cornea Fr.
Calocera palmata Schum.
Calocera viscosa Pers.
*Coprinus sp.
Dacryomyces stillatus Nees.
*Discomyces caprae Silberschmidt
*Discomyces Eppingeri Silberschmidt Gasp.
*Epicoccum purpurascens Ehrenberg
*Fusarium aquaeductum (Rabenh.) Radlkof.
*Fusarium metachroum Appel et Wollenw.
*Lactarius sanguifluus Fries
*Monascus purpureus Went
*Monascus sp.
*Monilia sitophila (Mont.) Dacc.
*Mucor flavus Bainier
Nectria cinnabarina Tode
*Ozonium croceum Pers.
*Penicillium africanum Doebelt
*Penicillium purpurogenium Fleroff
*Penicillium No. 29 Thom.
Pholiota spectabilis Fr.
*Polyporus sulfureus (Bull) Fr.
Puccinia glumarum E. et H.
Russula rosacea Fr.
*Saccharomyces glutinis (Frees) Cohn.
*Saccharomyces rosaceus Frankl.
*Sphaerostilbe coccophila Tul.
*Torula cinnabarina Jörgensen.
*Torula rubra Schimonn
*Verticillium rufum (Schwabe) Rabenh.

Säurenmethode.

Bei Behandlung grüner Pflanzenteile mit verdünnten Säuren beobachtete Frank[1]) die Bildung von roten oder rötlich gelben Kristallen, besonders bei den Spaltöffnungen. Molisch[2]) wiederholte den Versuch mit Elodea-Blättern und bestätigte die Beobachtung von Frank.

---

1) Siehe A. Tschirch, Untersuchungen über das Chlorophyll. Landw. Jahrb. 1884, Bd. XIII, pag. 490. Hans Molisch, l. c. pag. 26.

2) l. c. pag. 26.

Nach Molisch stimmen die Kristalle mit denen, die man mittels der Kalimethode bekommt, überein. Tammes[1]) untersuchte eine große Anzahl Pflanzen und verschiedene Pflanzenteile mit verdünnten Säuren, nämlich mit Salzsäure, Oxalsäure, Weinsteinsäure, Chromsäure, Pikrinsäure, Essigsäure und Fluorwasserstoffsäure. Die Pikrinsäure wandte sie in 50%iger alkoholischer Lösung an, die anderen Säuren in wässerigen Lösungen verschiedener Stärke. Bei Blättern und anderen grünen Pflanzenteilen, grünen Algen und Fucaceen führte die Untersuchung zu positiven Resultaten. In allen untersuchten Fällen, gut 30, bildeten sich nach einigen Stunden oder Tagen Kristalle, die aus Carotin bestanden und vollkommen übereinstimmten mit den Kristallen, die man mittels der Kalimethode erhält. Bei gelbbunten, herbstlich gelben und etiolierten Blättern führte die Untersuchung zu negativen Resultaten. Aus welcher Ursache in diesen Blättern das Carotin nicht auskristallisierte, blieb der genannten Forscherin unbekannt[2]).

Wenn man chlorophyllhaltige Pflanzen oder Plfanzenteile mit verdünnten Säuren untersucht, muß man die Einwirkung der Säuren auf das Chlorophyll berücksichtigen. Bei Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes löst sich das Chlorophyll. Dieses wird verseift, wobei Chlorophyllinkalium entsteht und Phytol sich abspaltet[3]). Bei der Einwirkung von Säuren entstehen aber unlösliche Chlorophyllderivate. Willstätter, welcher kalt gewonnene, alkoholische Extrakte getrockneter Blätter mit Säuren behandelte, erhielt, während das Magnesium eliminiert wurde, Phäophytin[4]). Wie das Chlorophyll[5]), besteht das Phäophytin aus zwei Komponenten, nämlich aus Phäophytin a (Phytilphäophorbid a) und Phäophytin b (Phytilphäophorbid b).

---

1) l. c. pag. 216ff. und pag. 242ff.

2) l. c. pag. 220.

3) Richard Willstätter (Untersuchungen über Chlorophyll), II. Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Justus Liebig's Annalen der Chemie 1906, Bd. CCCL, pag. 48. Richard Willstätter und Ferdinand Hocheder, III. Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll, l. c. Bd. CCCLIV, 1907, pag. 205.

4) R. Willstätter, II. Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls, l. c. R. Willstätter und F. Hocheder, l. c. Richard Willstätter und Max Isler, XX. Über die zwei Komponenten des Chlorophylls, l. c. Bd. CCCXC, 1912, Heft 3, pag. 269.

5) Richard Willstätter und Max Utzinger, XVI. Über die ersten Umwandlungen des Chlorophylls, l. c. Bd. CCCLXXXII, pag. 129. R. Willstätter und M. Isler, l. c.

Frühere Forscher haben auch schon Produkte untersucht, die sie durch Einwirkung von Säuren auf das Chlorophyll bekommen hatten. Hoppe-Seyler[1]) erhielt aus Gras durch Extraktion mit kochendem Alkohol ein kristallinisches Chlorophyllderivat, das er einer Anzahl Operationen unterwarf, um es von anderen Stoffen zu trennen und zu reinigen. Er nannte dieses Chlorophyllderivat Chlorophyllan. Tschirch[2]) erwähnt, daß, wenn man chlorophyllhaltige Pflanzen mit Säuren behandelt, Chlorophyllan in den Zellen auskristallisiert. Willstätter, Isler und Hug[3]) haben das Chlorophyllan von Hoppe-Seyler aufs neue untersucht und mit dem Phäophytin verglichen. Nach den genannten Forschern ist das Chlorophyllan keine reine Verbindung, sondern ein durch Pflanzensäure zersetztes und bei der Behandlung mit Lösungsmitteln mehr oder weniger weitgehend allomerisiertes Chlorophyll. Daher finden sie es unzweckmäßig, die Bezeichnung Chlorophyllan für das durch Säure gebildete Spaltungsprodukt des Chlorophylls anzuwenden.

Tammes[4]) bespricht auch die Einwirkung von Säuren auf das Chlorophyll und kommt dabei zu dem Schluß, daß die Bildung des Chlorophyllans der Nachweisung des Carotins nicht schadet, weil die erhaltenen Kristalle, obschon sie vielleicht mit etwas Chlorophyllan verunreinigt sein können, der Hauptsache nach doch aus Carotin bestehen. Kohl[5]) ist offenbar mit Tammes ganz einverstanden. Kohl schreibt: „Mehr oder minder unbewußt ist die Säuremethode schon früher von einigen Forschern angewandt worden, unbewußt insofern, als das auskristallisierende Carotin irrtümlich für Chlorophyllan gehalten und nur in einzelnen Fällen als solches erkannt wurde“. Jch finde die Auseinandersetzung von Tammes nicht zutreffend und Kohl begründet seine Behauptung nicht. Eine einfache Untersuchung der Kristalle zeigt, daß sie sich von Carotinkristallen sehr unterscheiden, und daß es selbst überhaupt keinen Grund gibt, sie als etwas carotinhaltig zu betrachten.

Auf frische, chlorophyllhaltige Pflanzenteile und Pflänzchen ließ ich bei der gewöhnlichen Temperatur Säuren einwirken, nämlich Oxalsäure von 1 und 10%, Salzsäure von 5%, Weinsteinsäure von 10% und Fluorwasserstoffsäure von 2%. Ohne Ausnahme hatten sich nach einem

---

1) F. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie 1879, 3, pag. 339.
2) l. c. pag. 441.
3) R. Willstätter und M. Isler, l. c. pag. 287ff. und pag. 337.
4) l. c. pag. 217 und pag. 218.
5) l. c. pag. 47.

Tag in den Objekten Kristalle ausgeschieden. Diese bilden kleine Aggregate, die an den Chromatophoren festsitzen. Die Kristallaggregate sind sphärischen Körperchen ähnlich, aber bei starker Vergrößerung kann man die Kristallplättchen, aus denen sie zusammengesetzt sind, unterscheiden. Nur in einem Fall, nämlich bei Cladophora conglomerata, sah ich aus den Aggregaten lange peitschenförmige Kristalle hervorragen. Die Kristallaggregate sind nicht, wie Carotinoidkristalle deutlich gelb, orangegelb, orange, orangerot oder rot, sondern braun. In Azeton lösen sie sich sehr leicht, schwer in Eisessig. Konzentrierte oder etwas verdünnte Schwefelsäure, z. B. 66½%ige, färbt die Aggregate nicht blau, sondern grün (Kl. et V. 326). Niemals aber ist diese Farbe derjenigen blauen Farbe, welche die Carotinoidkristalle annehmen, ähnlich, welche nie eine grüne, sondern bisweilen wohl etwas violette Nuance zeigt. Die grün gefärbten Aggregate lösen sich in der Schwefelsäure. Konzentrierte Salzsäure (38%ige) färbt die braunen Kristallaggregate auch grün; darauf lösen sie sich allmählich auf. Konzentrierte Salpetersäure färbt sie nicht wie Carotinoide vorübergehend blau; die braunen Kristallaggregate verflüssigen und bilden Kügelchen, die unter schwacher Erwärmung allmählich farblos werden und vermutlich aus Phytol bestehen. Auch Bromwasser färbt die braunen Aggregate nicht wie Carotinoide vorübergehend blau; die braune Farbe ändert sich anfangs nicht. Auch Kalilauge gegenüber verhalten die braunen Kristallaggregate sich ganz anders als die Carotinoidkristalle. Die braunen Kristallaggregate lösen sich. Auch lösen sie sich vollkommen in verdünnter, alkoholischer Kalilauge, z. B. in dem Molisch'schen Reagens, in dem die Carotinoidkristalle natürlich unlöslich sind. Weil sie bei der Auflösung nichts zurücklassen, hat man keinen Grund anzunehmen, daß sie Carotin oder Carotinoide enthalten.

Das Verhältnis der braunen Kristallaggregate zu Reagenzien zeigt, daß sie aus einem Chlorophyllderivat bestehen. Dieselben Reaktionen gibt auch Phäophytin[1]), das bisweilen auch mehr oder weniger eine deutliche kristallinische Struktur zeigt. Tammes und Kohl haben Carotin mit einem Chlorophyllderivat verwechselt. Besonders Fig. 22 von Tammes von Elodea canadensis zeigt deutlich, daß eine derartige Verwechslung stattgefunden hat. In jeder Zelle sind viele braune, runde Kristallaggregate an und auf den Chromatophoren abgebildet. Die kristallinische Struktur ist in der Figur nicht angegeben, aber in den vollen Zellen auch nicht immer leicht zu unterscheiden. Außer diesen Kristall-

1) R. Willstätter und F. Hocheder, l. c. pag. 222 und pag. 223.

aggregaten fand ich in vielen Zellen, jedoch nicht in allen, rote Kristallaggregate, die dem Carotin ähnlich sahen und durch konzentrierte oder etwas verdünnte Schwefelsäure, nämlich durch 76%ige, blau gefärbt wurden. Diese Kristallaggregate hat Tammes nicht abgebildet und auch nicht erwähnt.

Jetzt ist es einigermaßen begreiflich, daß Tammes[1]) bei gelbbunten Blättern, gelben Herbstblättern und etiolierten Blättern negative Resultate erhielt. Diese Objekte oder deren gelbe Teile enthalten kein Chlorophyll, und daher können in denselben keine braunen Kristallaggregate eines Chlorophyllderivates entstehen. Hiermit ist aber noch nicht alles erklärt. Denn die nicht grünen Teile der bunten Blätter und die Herbstblätter und die etiolierten Blätter enthalten doch Stoffe, die den Carotinoiden angehören. Diese hat Tammes nicht gefunden, während diese Forscherin bei anderen nicht grünen Pflanzenteilen, nämlich bei Blüten immer nach einigen Tagen gut gebildete Kristalle erhielt, die mit Reagenzien die für das Carotin charakteristischen Reaktionen zeigten. Daß in den gelben Teilen der gelbbunten Blätter Carotinoide vorhanden sind, kann man leicht mit Hilfe des Molisch'schen Reagenzes nachweisen. Bald erhielt ich orangegelbe Kristalle, bald orangerote oder rote, die alle mit Reagenzien Carotinoidreaktionen zeigten. Bei etiolierten Blättern gelangte Kohl[2]) zu einem anderen Resultate als Tammes. Ich bemerke, daß Kohl die Resultate von Tammes, mit denen er ganz einverstanden ist, nicht immer richtig angibt. Tammes schreibt: Ich habe auch gelbbunte, herbstlich gelbe und etiolierte Blätter in verdünnte Säurelösungen gebracht, aber stets mit negativen Resultaten. Und bei Kohl heißt es: Durch die neueren Untersuchungen der etiolierten Pflanzen mit Säuren, welche T. Tammes in großer Zahl ausführte und welche ich, um in die unsicheren Anschauungen einige Klarheit zu bringen, planmäßig fortgesetzt habe, ist es nun mit Sicherheit erwiesen, daß in allen etiolierten Pflanzenteilen, so weit sie gelb gefärbt, durch verdünnte Säuren Carotinkristalle zur Ausscheidung gebracht werden können.

Ich selbst habe sehr verschiedene chlorophyllhaltige und chlorophyllfreie Objekte, grüne und gelbbunte Blätter, gelbe, orangegelbe und orange Blüten, Früchte und Algen bei der gewöhnlichen Temperatur mit Säuren behandelt, nämlich mit 1-, 2- und 10%iger Oxalsäure, mit 1- und 5%iger Salzsäure, mit 10%iger Weinsteinsäure und mit 2%iger Fluorwasserstoffsäure. Am meisten habe ich 10%ige Oxalsäure

1) l. c. pag. 220.
2) l. c. pag. 48.

angewandt. Viele Objekte habe ich mit verschiedenen Säuren untersucht. Die Behandlung dauerte oft ein, zwei oder mehrere Monate.

Die folgenden Objekte habe ich auf obenerwähnte Weise mit Säuren untersucht.:

Blüten:
Die in der Tabelle auf Seite 383 und 384 genannten Blüten, ausgenommen: Chrysanthemum frutescens, Eranthis hyemalis, Gongora galeata, Kerria japonica, Kleinia Galpini, Narcissus poeticus, Tulipa Gesneriana.

Grüne Blätter:
Chelidonium majus, Elodea canadensis, Selaginella Kraussiana, Taraxacum officinale, Triticum repens, Urtica dioica.

Gelbbunte Blätter:
Croton ovalifolius, Graptophyllum pictum, Sambucus nigra.

Algen:
Anabaena, Cladophora glomerata, Haematococcus pluvialis, Nodularia, Nostoc, Spirogyra.

Früchte:
Solanum Lycopersicum, Sorbus aucuparia.

Wurzel:
Daucus Carota.

In allen chlorophyllhaltigen Objekten, auch in Blaualgen und in den grünen Teilen chlorophyllhaltiger Objekte, entstanden unter dem Einfluß von Säuren die oben besprochenen braunen Kristallaggregate. In jeder chlorophyllhaltigen Zelle bildeten sie sich. In den meisten Fällen, nämlich in den ganz grünen Blättern, in den gelbbunten von Sambucus nigra und in Anabaena konnte ich außerdem rötliche Kristallchen wahrnehmen. In dem gelben Teil der gelbbunten Blätter von Graptophyllum pictum fand Ausscheidung orangeroter Plättchen und sehr kleiner orangegelber Kristallaggregate statt.

In Blüten erhielt ich mit der Säurenmethode meistens keine Ausscheidung von Kristallen. Nur in zwei Fällen war das Resultat positiv, nämlich bei Asclepias curassavica, wo Ausscheidung von rötlichen Kristallen stattfand, von denen viele die Form von Parallelogrammen hatten, und bei Calceolaria rugosa, wo kleine orangegelbe Aggregate sich ausschieden. Bei den zwei obengannten Früchten und bei der Wurzel von Daucus Carota war die Untersuchung erfolglos.

Die roten und orangegelben Kristalle, welche durch Säureeinwirkung auskristallisieren, verhalten sich Reagenzien gegenüber wie Carotinoidkristalle.

Die Ausscheidungen, die man mittels der Säurenmethode erhält, sind im allgemeinen gering. Sie befinden sich in den Zellen nebst orangenen und gelben Kugeln und Massen. Offenbar kristallisiert nur ein Teil der Carotinoide aus.

Die Untersuchung der Blüten hat zu Resultaten geführt, welche sehr von denen, die Tammes[1]) erhielt, abweichen. Während diese Forscherin in allen Fällen gut gebildete Kristalle erhielt, konnte ich nur in zwei der 33 untersuchten Blüten Ausscheidung von Kristallen beobachten.

Auf Grund der obenerwähnten Resultate darf ich annehmen, daß die Säurenmethode für die Auskristallisierung der Carotinoide in den Pflanzen im allgemeinen keine Empfehlung verdient. Wie Molisch[2]) mit Recht behauptet, ist die Kalimethode viel besser. In einigen Fällen läßt die Säurenmethode den Forscher ganz im Stiche. Besonders die gelben Carotinoide kristallisieren meistens nicht aus. Häufig scheiden sich rote Kristalle im Gewebe aus. In mehreren Fällen aber, in welchen die Kalimethode zu positiven Resultaten führt, bilden sie sich nicht. Das ist unter anderen der Fall in den Blüten von Nuphar luteum, Isatis tinctoria, Cytisus Laburnum und Thermopsis lanceolata und in den Blumenstielchen von Trollius caucasicus. In diesen Fällen bekommt man mit dem Molisch'schen Reagens viele orangegelbe und wenig rote Kristalle. In der Blüte von Asclepias curassavica dagegen, in welcher unter dem Einfluß von Säuren rote Kristalle auskristallisieren, erhält man mit der Kalimethode viel rote und wenig orangegelbe. Falls die Carotinoide, welche rote Kristalle bilden, in großer Quantität verhanden sind, kann man sie mit Säuren nachweisen. Wenn sie aber in geringer Quantität anwesend sind, entgehen sie der Beobachtung.

Ein großer Nachteil der Säurenmethode ist der, daß die orangegelben Carotinoide sehr der Zersetzung ausgesetzt sind. Eine lange dauernde Einwirkung der Säure unter Verhältnissen, wie bei der Säurenmethode vorliegen, schadet oft sehr und kann zu einer völligen Zersetzung der Carotinoide führen. Sie sind viel mehr der Zersetzung durch Säuren ausgesetzt, wenn sie noch in der fettartigen Substanz der Plastiden gelöst sind, als wenn sie auf die eine oder andere Weise in der Form von

---

1) l. c. pag. 243.

2) Hans Molisch, Mikrochemie der Pflanze 1913, pag. 227.

Kristallen ausgeschieden worden sind. Nach Husemann[1]) hatte Wackenroder schon in 1832 auf diese Zersetzung hingewiesen. Bei der Säurenmethode kann man bisweilen schon nach einigen Tagen Zersetzung konstatieren. Die Farbe der Blüten wird schwächer und die gelben oder orangenen ölartigen Kugeln und Massen, die sich in den Zellen gebildet haben und das Carotinoid enthalten, verlieren auch mehr oder weniger ihre Farbe. Durch Schwefelsäure werden sie dann gar nicht oder viel schwächer blau gefärbt als beim Anfang des Versuches. Das Carotinoid zersetzt sich und kristallisiert nicht aus. Die Zersetzung kann man unter anderen leicht feststellen bei den Blüten von Chelidonium majus, Narcissus Pseudonarcissus, Doronicum Pardalianches und Tulipa hortensis.

Für die Ausscheidung der Carotinoide in der Form von Kristallen in den Zellen oder in den Geweben hat Tammes besonders Fluorwasserstoffsäure empfohlen. Bei einigen Objekten, nämlich bei den Blüten von Asclepias curassavica, Calceolaria rugosa und Inula Helenium und beim Blatt von Urtica dioica habe ich diese Säure geprüft. Die Resultate bei diesen Objekten stimmten mit denen, die ich mit anderen verdünnten Säuren erhielt, überein. Im allgemeinen macht es wenig aus, welche Säure man anwendet. Die Kieselfluorwasserstoffsäure scheint keinen Vorteil vor anderen Säuren voraus zu haben. Wohl ist die Anwendung dieser Säure mit einem Nachteil verbunden, nämlich ihre Eigenschaft, das Glas stark anzugreifen, wogegen man Vorsichtsmaßregeln treffen muß.

Resorzinmethode.

Tswett[2]) hat eine Methode angegeben, um die Carotinoide in der Form von Kristallen in den Pflanzen oder Pflanzenteilen unter dem Mikroskop auszuscheiden. Man legt die Objekte auf den Objektträger in konzentrierte Resorzinlösung (10—12 Gewichtsteile Resorzin in 10 Gewichtsteilen Wasser).

In neun Fällen habe ich diese Methode geprüft, nämlich bei den Blättern von Urtica dioica, bei den Blüten von Chelidonium majus, Erysimum Perofskianum, Gazania splendens, Calceolaria rugosa und Narcissus Pseudonarcissus, bei der Frucht und dem Kelch von Physalis Francheti, bei Cladophora glomerata und bei Haematococcus pluvialis.

---

1) A. Husemann, Über Carotin und Hydrocarotin. Ann. der Chemie und Pharm. 1861, Bd. CXVII, pag. 200.

2) l. c. pag. 630.

In fünf Fällen, nämlich bei Urtica, Chelidonium, Calceolaria, Narcissus und Cladophora konnte ich bald Ausscheidung von Kristallen beobachten. Bei Chelidonium, Calceolaria und Cladophora entstanden die Kristalle in den Zellen, bei Urtica und Narcissus auch außerhalb der Präparate. Bei Erysimum, Gazania und Haematococcus erhielt ich mit Resorzinlösung negative Resultate, während die Kalimethode zu positiven führte. Bei Haematococcus pluvialis konnte Jacobsen[1]) auch keine Ausscheidung von Kristallen durch Resorzinlösung bekommen.

Die Form der Kristalle ist sehr verschieden. Tswett[2]) hat auch schon auf diese Verschiedenheit hingewiesen und bei Lamium mit Hilfe seiner Adsorptionsmethode gezeigt, daß verschiedene chemische Körper, Carotin und Xanthophyll, anwesend sind.

In den Fällen, wo ich mit dem Molisch'schen Reagens rote und orangegelbe Kristalle erhielt, erhielt ich auch dergleichen mit der Resorzinlösung, aber unter der Bedingung, daß der Versuch zu einem positiven Resultate führte.

Reagenzien gegenüber verhalten die Kristalle sich der Hauptsache nach auf dieselbe Weise wie die Carotinoidkristalle, die man mit der Kalimethode bekommt. Doch können die auf beiderlei Weise erhaltenen Kristalle, was Farbe, Form und Verhältnis zu Reagenzien betrifft, verschieden sein. Bei Narcissus Pseudonarcissus z. B. bekommt man mit dem Molisch'schen Reagens orangegelbe (Kl. et V. 151), plättchenförmige Kristalle und mit dem Tswett'schen Reagens orangefarbige (Kl. et V. 126) Kristallaggregate, während beiderlei Kristalle Reagenzien und Lösungsmittel gegenüber außerdem noch kleine Unterschiede zeigen.

Es lohnt wahrscheinlich die Mühe, die Resorzinmethode eingehender zu studieren und ihre Resultate mit denen der Kalimethode zu vergleichen.

Neue Methoden.

Chloralhydrat. Kohl[3]) hat bemerkt, daß man für die Auskristallisierung des Carotins wahrscheinlich auch andere Stoffe anwenden kann. Er vermutet, daß das Chloralhydrat dafür in Betracht kommen könnte, was er zu untersuchen beabsichtigt. Wenn man beobachtet, daß die Carotinkristalle dem Chloralhydrat sehr lange Wider-

1) H. C. Jacobsen, Die Kulturbedingungen von Haematococcus pluvialis. Folia Microbiologica 1912, I, pag. 25.

2) l. c.

3) l. c. pag. 124.

stand leisten im Gegensatz zu den Xanthophyllkristallen, und wenn man dabei auch die lösende Wirkung des Chloralhydrates auf verschiedene Bestandteile des Zellinhalts berücksichtigt, so könnte man vermuten, daß das Chloralhydrat ein geeignetes Mittel für die Auskristallisierung des Carotins sei.

Das Chloralhydrat habe ich in konzentrierter Lösung (7 Gewichtsteile in 3 Gewichtsteilen Wasser) bei den Blättern von Urtica dioica geprüft. Wir wissen durch die Untersuchungen von Willstätter und Mieg[1]), daß diese Blätter Carotin und Xanthophyll enthalten. Als ich ein Stückchen des chlorophyllhaltigen Gewebes in die Chloralhydratlösung brachte und unter dem Mikroskop beobachtete, konnte ich bei den Chromatophoren bald Veränderungen wahrnehmen, und sah ich in jeder Zelle eine Kugel entstehen, die sich allmählich löste und ein kleines Aggregat roter Kristallchen zurückließ. Orangegelbe Xanthophyllkristalle schieden sich nicht aus. Wie zu erwarten war, kann deshalb die Methode für die Ausscheidung von Xanthophyll nicht in Betracht kommen, weil es zersetzt wird. Für die Ausscheidung von Carotinkristallen darf ich sie aber auch nicht empfehlen, weil das Chloralhydrat auch das Carotin angreift und kleine Quantitäten desselben deshalb der Beobachtung entgehen könnten.

Phenol. Nach Willstätter und Mieg[2]) ist das Xanthophyll in Phenol „spielend“ löslich. Viele Stoffe lösen sich in verflüssigtem Phenol, das Carotin aber um vieles langsamer als das Xanthophyll. Auf Grund dieser Tatsachen erhob sich die Frage, ob verflüssigtes Phenol vielleicht für die Ausscheidung des Carotins und verwandter Carotinoide dienen könnte. Ich entschloß mich, dieses in einigen Fällen zu untersuchen.

Ich wandte zwei Gemische an. Das eine bestand aus 10 Gewichtsteilen Phenol in losen Kristallen und einem Gewichtsteil Wasser und das andere aus drei Gewichtsteilen Phenol in losen Kristallen und einem Gewichtsteil Glyzerin. Dem letzteren Gemisch gab ich den Vorzug, weil es sich schneller mit dem Wasser, das den Objekten anhaftet, vermischt.

Ich untersuchte die Blüten von Erysimum Perofskianum, Asclepias curassavica, Taraxacum officinale und Gongora galeata, das Blatt von Urtica dioica, die Frucht von Rosa rugosa und die Frucht und den Kelch von Physalis Francheti.

---

1) l. c. pag. 10.
2) l. c.

Bei den Blumenblättern von Erysimum Perofskianum hatte die Kalimethode kein befriedigendes Resultat gegeben, und die Säurenmethode war erfolglos. Teile der Blumenblätter legte ich zwischen Objektträger und Deckglas in die oben angegebenen Gemische. Unter dem Mikroskop sah ich, daß die orangenen Plastiden sich bald in orangegelbe Kugeln umwandelten; bald entstanden in diesen Kugeln Kristalle. Während die Kugeln sich auflösten, blieben die Kristalle zurück. Es sind orangerote Plättchen und Aggregate, die sich sehr langsam in dem Phenolgemisch lösen. Wenn man die Kristalle untersuchen will, muß man die Präparate erst mit verdünntem Alkohol (70%igem) und darauf mit Wasser auswaschen. Mit Reagenzien zeigen sie die für die Carotinoide charakteristischen Reaktionen.

Wenn man Teile der Blüte von Asclepias curassavica in das Gemisch von Phenol und Glyzerin legt, entstehen bald in allen Zellen auf ähnliche Weise wie bei Erysimum Perofskianum zahlreiche hell- und dunkelrote oder orangerote (Kl. et V. 11, 46, 51, 71, 91) Kristalle, unter denen sich viele Plättchen und Aggregate befinden. Sie lösen sich nicht in der Phenollösung; wenigstens ändern sie in 3 Tagen ihr Äußeres nicht. Mit Reagenzien zeigen sie die für die Carotinoide charakteristische Reaktionen.

Im Gewebe des Blattes von Urtica dioica bildeten sich hier und da orangerote (Kl. et V. 81) Kristallaggregate, die ich nach 3 Tagen in dem Gemisch von Phenol und Glyzerin noch beobachten konnte. In den Blüten von Taraxacum officinale bildeten sich bald gelbe Kugeln, die sich schnell lösten; Kristalle schieden sich nicht aus. In der Blüte von Gongora galeata und in der Frucht von Rosa rugosa beobachtete ich Auflösung der Plastiden, aber keine Auskristallisation der Carotinoide. Bei Physalis Francheti konnte ich nach einer Woche noch keine Änderung der Plastiden wahrnehmen.

Offenbar finden sich in den sechs obengenannten Objekten Carotinoide, die, was ihre Löslichkeit in einem Gemisch von Phenol und Glyzerin betrifft, sehr verschieden sind. Sie lösen sich in diesem Gemisch schnell, langsam oder gar nicht auf. Wenn sie leicht löslich sind, können sie sich natürlich nicht kristallinisch ausscheiden. Auch wenn die Plastiden dem Gemisch Widerstand leisten und das Carotinoid festhalten, wie bei Physalis, ist das Resultat negativ. Die Lösung der Frage, inwiefern Phenol Wert hat für die Nachweisung des Carotins und verwandter Carotinoide in der Form von Kristallen in den Pflanzen erfordert ausführlichere Untersuchungen.

Pyridin, Picolin, Lutidin, Piperidin. Außer den schon erwähnten Stoffen gibt es noch andere, mit denen die Auskristallisierung der Carotinoide in den Zellen gelingt. Wie ich bei dem Arillus von Evonymus latifolius und bei der Blüte von Narcissus Pseudonarcissus feststellen konnte, ist das der Fall mit Pyridin, Picolin, Lutidin und Piperidin.

Alkohol. Willstätter und Mieg[1]) haben die Frage, ob das Xanthophyll, wie das Carotin, auch in der lebendigen Pflanze vorkommt, behandelt und darauf eine bejahende Antwort gegeben. Beide Stoffe kann man nämlich mit einfachen Lösungsmitteln ausscheiden, das Carotin aus getrockneten Blättern mit Petroleumäther, das Xanthophyll aus den alkoholischen Extrakten frischer Blätter nach den Entmischungsmethoden von G. G. Stokes, G. Kraus, H. C. Sorby und R. Sachsse[2]). Es liegt also auf der Hand anzunehmen, daß in einigen Fällen die Anwendung einfacher Lösungsmittel, in welchen die Carotinoide selbst nicht oder weniger löslich sind, zu ihrer Ausscheidung führen könnte. In der Tat gelingt diese in einigen Fällen mit solchen.

Bei den zungenförmigen Blüten von Taraxacum officinale und Doronicum Pardalianches gelang es mir, mit dem Molisch'schen Reagens überhaupt nicht das Carotinoid in Kristallform auszuscheiden. Es blieb in den gelben oder orangegelben Kugeln, die sich in den Zellen gebildet hatten, gelöst. Als ich darauf eine Blüte sehr kurze Zeit mit absolutem Alkohol oder mehrere Blüten mit sehr wenig absolutem Alkohol behandelt hatte, konnte ich beobachten, daß der ölartige Stoff, der das Carotinoid festhielt, sich gelöst hatte und dieses sich zum Teil mehr oder weniger kristallinisch ausgeschieden hatte. Diese Ausscheidung gab mit Reagenzien die für die Carotinoide charakteristischen Reaktionen. Direkte Behandlung der Blüten mit absolutem Alkohol führte zu Übereinstimmung mit den eben erwähnten Resultaten. Behandelt man zu lange mit absolutem Alkohol oder nimmt man eine zu große Quantität, so löst sich das Carotinoid ganz auf.

In einigen Fällen gelang es mir schon mit verdünntem Spiritus Ausscheidung von Carotinoiden in der Form von Kristallen zu erhalten. Die Blumenkrone von Calceolaria rugosa enthielt nach einem Aufenthalt von einem Tage in 70%igem Spiritus orangegelbe Kristalle, lose Plättchen und Aggregate. Die Blumenblätter von Chelidonium majus enthielten nach einem monatlichen Aufenthalt in 20%igem Spiritus nebst orangegelben und gelben Kugeln und Kügelchen auch orangegelbe, nadelförmige

---

1) l. c. pag. 10.
2) Siehe Willstätter und Isler, l. c. pag. 275ff.

und fadenförmige Kristalle, welche gerade oder stark gebogen und lang sind. Die Kugeln hafteten oft an den Kristallen. Ich erhielt den Eindruck, daß die Kristalle aus den Kugeln hervorgekommen waren. In der Blüte von Narcissus Pseudonarcissus beobachtete ich nach einem Aufenthalt von einem Tage in 20%igem Spiritus eine kristallinische Ausscheidung von Carotinoid.

Was die Anwendung von verdünntem Spiritus betrifft, bemerke ich, daß eine lange dauernde Behandlung der Objekte zur völligen Zersetzung der Carotinoide führen kann. Bei Narcissus Pseudonarcissus war das schon nach einigen Tagen der Fall.

Erwärmung bis auf 140° C in 10%iger Lösung von Kaliumhydroxyd in Glyzerin und in Glyzerin allein. Erwärmung in 10%iger Lösung von Kaliumhydroxyd in Glyzerin bis auf 140° C bewirkte in einigen Fällen, nämlich bei den Früchten von Solanum Lycopersicum, Solanum Dulcamara, Aglaonema commutatum und Tamus communis, Ausscheidung von gut gebildeten, rotvioletten, plättchenförmigen Carotinoidkristallen. Bei der Tomate führte schon Erwärmung in Glyzerin bis auf 140° C zu demselben Resultate.

Das Verhältnis der Carotinoide zu Reagenzien und Lösungsmitteln.

Mit den folgenden Reagenzien zeigen die Carotinoide Färbungen: mit konzentrierter Schwefelsäure, Schwefligsäure, konzentrierter Salpetersäure, Bromwasser, konzentrierter Salzsäure mit ein wenig Phenol oder Thymol und mit Jodjodkaliumlösung oder Jodchloralhydrat. Mit Ausnahme der Jodreagenzien, die meist Grünfärbung hervorrufen, verursachen alle genannten Reagenzien Blaufärbung.

Im folgenden gebe ich die Resultate über die Anwendung von Schwefelsäure, Salpetersäure, Bromwasser, Jodjodkaliumlösung und einigen neuen Reagenzien für Carotinoide, nämlich Selensäure und konzentrierte Lösungen von Antimonchlorür, Zinkchlorid und Aluminiumchlorid in 25- oder 38%iger Salzsäure, an. Außer Reagenzien können auch Lösungsmittel mit Erfolg bei der mikroskopischen Untersuchung der Carotinoide angewandt werden. Hierüber wird im folgenden auch etwas angeführt.

Schwefelsäure.

Tammes[1]), die bei ihrer Untersuchung über Carotin konzentrierte Schwefelsäure, konzentrierte etwas phenolhaltige Salzsäure, konzentrierte Salpetersäure und Bromwasser anwandte, trocknete die Präparate

1) l. c. pag. 213.

so lange im Exsikkator über Schwefelsäure, bis sie vollkommen trocken waren. Nach Tammes ist das bei der Anwendung von Schwefelsäure und phenolhaltiger Salzsäure absolut notwendig und bei der Anwendung von Salpetersäure und Bromwasser empfehlungswert. Selbst wenn die Präparate nur einigermaßen feucht sind, mißlingen nach genannter Forscherin die Reaktionen oft, was besonders bei Schwefelsäure auf die Anwesenheit von äußerst geringen Quantitäten Wasser zurückzuführen ist. Sowohl bei der Untersuchung der in den Zellen und Geweben ausgeschiedenen Kristalle wie bei der von Pflanzen und Pflanzenteilen, welche noch nicht mit anderen Reagenzien behandelt worden sind, schreibt Tammes sorgfältig Trocknen der Präparate vor.

Kohl[1]) ist mit der Ansicht genannter Forscherin ganz einverstanden. Ich habe jedoch nicht den Eindruck erhalten, daß seine Meinung sich auf Versuche gründet. G. und F. Tobler[2]) haben bemerkt, daß die Behauptung, die Reaktion mit Schwefelsäure gelingt nur mit wasserfreien Objekten, falsch ist und Rothert[3]) hat erwähnt, daß er, wenn er nach der Vorschrift von Tammes arbeitete, unbefriedigende Resultate erhielt und bald zu der Überzeugung gelangte, daß das Austrocknen der Präparate ganz überflüssig ist.

Was die Arbeitsmethode von Tammes betrifft, bemerke ich, daß man theoretisch nicht erklären kann, aus welchem Grunde das Austrocknen der Präparate stattfinden muß, denn konzentrierte Salpetersäure enthält 50% Wasser, konzentrierte Salzsäure 75% und Bromwasser ist eine gesättigte Lösung von Brom in Wasser und enthält fast 97% Wasser, während konzentrierte Schwefelsäure 4—6% Wasser enthält. Nur bei der Anwendung konzentrierter Schwefelsäure würde ich mir vorstellen können, daß geringe Quantitäten Wasser in den Präparaten einen Einfluß ausüben könnten, aber in diesem Fall gibt es ein viel einfacheres Mittel, als das starke Austrocknen der Präparate, nämlich die Anwendung von Nordhäuser Schwefelsäure, welche mit dem Wasser, mit dem sie in Kontakt kommt, Schwefelsäure bildet ($H_2S_2O_7 + H_2O = 2\,H_2SO_4$). Nordhäuser Schwefelsäure wirkt deshalb noch intensiver als konzentrierte Schwefelsäure.

---

1) l. c. pag. 44.

2) G. und F. Tobler, Untersuchungen über Natur und Auftreten von Carotinen. III. Zur Bildung des Lycopins und über Beziehungen zwischen Farb- und Speicherstoffen bei Daucus. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 1912, 30. Jahrg., Heft I, pag. 33.

3) W. Rothert, Über Chromoplasten in vegetativen Organen. Bulletin intern. de l'académie des sciences de Cracovie, Classe des sciences mathém. et nat. Sér. B., sciences nat. Année 1912, pag. 218.

Wie es sich unten zeigen wird, ist die Behauptung, daß äußerst geringe Quantitäten Wasser die Reaktion verhindern können, überhaupt falsch. Im Gegenteil gelangt man zu den besten Resultaten mit einigermaßen verdünnter Schwefelsäure. Durch Mischung von konzentrierter Schwefelsäure von 95% mit 10, 20, 30, 40 und 50% Wasser, erhielt ich verdünnte Schwefelsäure von 85½, 76, 66½, 57 und 47½%.

Bei ungefähr 125 Objekten, bei Blüten, Blättern, Früchten, Algen, Fungi usw., habe ich Schwefelsäure verschiedener Stärke geprüft. Die Carotinoide, die selten in der Natur im kristallinischen Zustande vorkommen, wurden zuvor mit Hilfe des Molisch'schen Reagenzes in der Form von Kristallen ausgeschieden, was mit Ausnahme von ein paar Fällen gelang. Die Schwefelsäure ließ ich unter dem Deckglase zu den Präparaten fließen, die sich in Wasser befanden, oder ich brachte sie zu den Präparaten, die in einer minimalen Quantität Wasser auf dem Objektträger lagen. Immer fand dabei eine geringe Verdünnung des angewendeten Gemisches mit dem Wasser statt, in dem das Präparat sich befand.

Das Resultat dieser Reihe von Versuchen war, daß die schöne Blaufärbung mit Schwefelsäure sich immer zeigte. In den meisten Fällen gelang die Reaktion schon mit Schwefelsäure von 66½ oder 76 %. Selten war es nötig Schwefelsäure von 85½% anzuwenden. In einigen Fällen wurde schon durch Schwefelsäure von 57% allmählich Blaufärbung oder Violettfärbung hervorgerufen, unter anderen bei der Blüte von Narcissus Pseudonarcissus, dem Blatt von Urtica dioica und Cladophora conglomerata. Bei der Blüte von Tulipa Gesneriana gelang die Reaktion selbst mit Schwefelsäure von 47½ und 38%.

Bei Anwendung stärkerer Schwefelsäure, nämlich von 95%, treten meist allerlei Nebenerscheinungen auf. Die Kristalle lösen sich bisweilen und bilden blaue Wölkchen in der farblosen Flüssigkeit. Oft verlieren die Kristalle ihre Form und fließen zu blauen Tropfen zusammen. Bisweilen entsteht nach der Lösung der Kristalle in der Nähe ein Präzipitat kleiner blauer Tropfen. Oft wird die blaue Farbe schwächer und verschwindet ganz. Manchmal beobachtet man einige der genannten Erscheinungen nacheinander. Es ist schwer festzustellen, inwiefern die Verschiedenheiten, die man bei der Einwirkung der Schwefelsäure beobachtet, durch zufällige Verhältnisse hervorgerufen werden und inwiefern sie von der chemischen Natur der Carotinoide abhängen. Es ist aber gewiß, daß auch dieses bei dem Verlauf der Reaktion eine Rolle spielt.

Bei vielen Objekten kommt es nämlich vor, daß in denselben Zellen sich zweierlei Kristalle ausscheiden, die sich zu Schwefelsäure auf ver-

schiedene Weise verhalten. Man kann sie vor der Einwirkung der Schwefelsäure schon an der Farbe und an der Form unterscheiden, besonders an der Farbe, die orangegelb oder orange und rot oder orangerot ist. Die Blaufärbung mit Schwefelsäure tritt bei beiderlei Kristallen nicht gleichzeitig ein und um sie hervorzurufen, bedarf man Schwefelsäure verschiedener Konzentration. Durch Schwefelsäure von 66½ oder 76% werden die orangegelben oder orangenen Kristalle sofort blau gefärbt und die roten oder orangeroten viel später oder gar nicht. Wenn die verschiedenen Kristalle ungefähr gleich dick sind und sich nebeneinander in denselben Zellen befinden, darf man annehmen, daß die Einwirkung der Schwefelsäure unter gleichen Verhältnissen stattfindet. Weil außer dem verschiedenen Verhalten zu Schwefelsäure sich Unterschiede in der Farbe und der Form zeigen und die Kristalle sich auch anderen Reagenzien und Lösungsmitteln gegenüber auf verschiedene Weise verhalten, was ich unten besprechen werde, so darf man annehmen, daß die Erscheinung mit Unterschieden in der chemischen Natur zusammenhängt.

Wenn konzentrierte Schwefelsäure auf ausgetrocknete Präparate einwirkt, bemerkt man nichts von dem verschiedenen Verhalten der Kristalle der Schwefelsäure gegenüber. Die Reaktion verläuft so schnell, daß sie bisweilen ganz der Beobachtung entgeht. Vor der Behandlung ausgetrockneter Präparate mit konzentrierter Schwefelsäure muß ich warnen, denn dieses vermindert sehr den Wert der schönen, für die mikrochemische Untersuchung ganz besonders geeigneten Reaktion.

Die lebhafte Farbe, die bei der Reaktion entsteht, nennt man gewöhnlich blau, bisweilen auch wohl blauviolett. Man kann sie blau nennen, obschon eine schwach violette Nuance bisweilen wahrnehmbar ist (vgl. Klincksieck et Valette, 426 und 451).

Eine Erklärung der Reaktion habe ich in der Literatur nicht gefunden. Husemann[1]) erwähnt, daß durch Wasser die blaue Farbe wieder verschwindet und das Carotin unverändert zurückbleibt. Wenn man die blaugefärbten Kristalle mit einer reichlichen Quantität Wasser behandelt, nehmen sie wieder ihre ursprüngliche orangegelbe oder rote Farbe an. Schwefelsäure ruft aufs neue Blaufärbung hervor.

Die Objekte, bei denen ich die Schwefelsäurereaktion studierte, sind alle, insofern es mit dem Molisch'schen oder einem anderen Reagens gelang Carotinoid nachzuweisen, auf pag. 383, 384 und 385 genannt.

---

1) l. c. pag. 226.

Salpetersäure.

In fast 50 Fällen habe ich die Carotinoide, nachdem ich sie mit dem Molisch'schen oder einem anderen Reagens in der Form von Kristallen in den Zellen ausgeschieden hatte, mit Salpetersäure von 50% untersucht. Mit Ausnahme von ein paar kleinen Objekten, die nur wenig Carotinoid enthielten, erhielt ich immer eine vorübergehend blaue Färbung, so daß wir annehmen dürfen, daß die Reaktion für Carotinoide allgemein ist. Nach der Einwirkung der Salpetersäure haben die Kristalle ihre ursprüngliche Farbe eingebüßt.

Die verschiedenen Carotinoide verhalten sich Salpetersäure gegenüber nicht ganz gleich. Bisweilen ist die Farbe nicht rein blau, sondern grünlichblau. Alle Carotinoide färben sich nicht gleich schnell blau und verlieren nicht gleich schnell die blaue Farbe. Bei dem Blatt von Chelidonium majus und bei Euglena konnte ich bemerken, daß die orangegelben Kristalle sich eher blau färbten als die roten und auch eher die blaue Farbe verloren. Bei der Frucht von Sorbus aucuparia trat die Blaufärbung und die Entfärbung bei den roten Kristallen eher ein als bei den orangefarbigen und bei den Früchten von Solanum Lycopersicum, Solanum Dulcamara und Aglaonema commutatum zeigten die rotvioletten Kristalle früher die Reaktion als die orangeroten, welche die blaue Farbe länger beibehielten.

Bei den folgenden Objekten beobachtete ich die Salpetersäurereaktion.

Blüten: Calendula arvensis, Chelidonium majus, Calceolaria rugosa, Clivia miniata, Cucurbita melanosperma, Dendrobium thyrsiflorum, Doronicum Pardalianches, Erysimum Perofskianum, Gazania splendens, Inula Helenium, Hieraceum aurantiacum, Kerria japonica, Kleinia Galpini, Lilium croceum, Narcissus Pseudonarcissus, Narcissus poeticus.

Blätter: Aglaonema commutatum, Calceolaria rugosa, Chelidonium majus, Cucurbita melanosperma, Erysimum Perofskianum, Urtica dioica.

Früchte: Aglaonema commutatum, Physalis Francheti, Rosa rugosa, Solanum Dulcamara, Solanum Lycopersicum, Sorbus Aria, Sorbus aucuparia.

Arillus: Evonymus latifolius.

Wurzel: Daucus Carota.

Algen: Ceramium rubrum, Chlorella protothecoides, Chlorella variegata, Chondrus crispus, Cystococcus humicola, Euglena sp.,

Fucus serratus, Fucus vesiculosus, Laminaria digitata, Laminaria saccharina, Nodularia sp., Zygnema cruciatum.

Fungi: Calocera viscosa, Dacryomyces stillatus, Monilia sitophila, Sphaerostilbe coccophila.

Brom.

In 65 Fällen studierte ich das Verhalten der Carotinoidkristalle Bromwasser gegenüber. In den meisten Fällen hatte ich sie mit Hilfe des Molisch'schen Reagenzes ausgeschieden. In fast allen Fällen nahmen die Kristalle eine blaue Farbe an, welche bald verschwand. Nur bei ein paar kleinen Objekten, die wenig Carotinoid enthielten, konnte ich die Reaktion nicht wahrnehmen. Auf Grund dieser Beobachtungen darf man annehmen, daß die Reaktion für Carotinoide allgemein ist. Nach Einwirkung des Broms haben die Kristalle ihre ursprüngliche Farbe eingebüßt.

Bei einigen Objekten zeigt die Reaktion geringe Abweichungen. Bisweilen ist die Farbe rein blau (Kl. et V. 426), meistens aber grünlich blau (Kl. et V. 381). Oft herrscht anfangs das Blau und später das Grün vor. Die rotvioletten (Kl. et. V. 581) Kristalle in der Frucht von Solanum Lycopersicum und anderen Früchten zeigen während der Einwirkung des Broms aufeinanderfolgend eine blauviolette (476), blaue, grünblaue (386) und grüne Farbe, die zuletzt verschwindet. Die Blaufärbung ist nicht immer gleich stark; die Reaktion tritt nicht immer gleich schnell ein und die Färbung verschwindet nicht gleich schnell. Bei den Blüten von Chelidonium majus und Spartium junceum ist die blaue Farbe schwach und schnell vorübergehend und herrscht gewöhnlich das Grün vor.

Bei den folgenden Objekten habe ich die Reaktion mit Bromwasser beobachtet:

Blüten: Asclepias curassavica, Calendula arvensis, Chelidonium majus, Calceolaria rugosa, Clivia miniata, Corydalis lutea, Cucurbita melanosperma, Cytisus sagittalis, Doronicum Pardalianches, Dendrobium thyrsiflorum, Eranthis hyemalis (Blumen- und Kelchblätter), Erysimum Perofskianum, Gazania splendens, Gongora galeata, Hieraceum aurantiacum, Hemerocallis Middendorffii, Isatis tinctoria, Inula Helenium, Iris Pseudacoris, Kleinia Galpini, Kerria japonica, Lilium croceum, Narcissus Pseudonarcissus, Narcissus poeticus, Spartium junceum, Thermopsis lanceolata, Tulipa Gesneriana.

Blätter: Aglaonema commutatum, Calceolaria rugosa, Chelidonium majus, Cucurbita melanosperma, Erysimum Perofskianum, Elodea canadensis, Dendrobium thyrsiflorum, Urtica dioica.

Früchte: Aglaonema commutatum, Capsicum annuum, Physalis Francheti (Frucht und Kelch), Rosa rugosa, Solanum Dulcamara, Solanum Lycopersicum, Sorbus Aria, Sorbus aucuparia, Tamus communis.

Arillus: Evonymus latifolius.

Wurzel: Daucus Carota.

Algen: Ceramium rubrum, Chlorella protothecoides, Chlorella variegata, Chondrus crispus, Cladophora conglomerata, Cystococcus humicola, Euglena sp., Fucus serratus, Fucus vesiculosus, Haematococcus pluvialis, Laminaria digitata, Laminaria saccharina, Nodularia sp., Zygnema cruciatum.

Fungi: Calocera viscosa, Dacryomyces stillatus, Monilia sitophila, Sphaerostilbe coccophila.

Jod.

Jod bildet mit Carotinoiden Jodadditionsprodukte. In gut 50 Fällen studierte ich das Verhalten der Carotinoidkristalle zu Jodjodkaliumlösung. In den meisten Fällen hatte ich sie mit Hilfe der Kalimethode ausgeschieden. Im allgemeinen nahmen die Kristalle mit Jod eine grüne Farbe an, aber die Farbe war oft nicht rein grün und besonders, wenn die Kristalle sich stark gefärbt hatten, war es oft sehr schwer, die Farbe zu bestimmen. Oft schien sie dunkel gelbgrün (Kl. et V. 258), bisweilen dunkelgelb (213, 218) oder blaugrün (352, 368, 372) und in einzelnen Fällen blauviolett (477) oder rotviolett (528, 568).

Oft färben die Kristalle sich sofort; in einigen Fällen färben sie sich allmählich, was bei den orangegelben Kristallen in den Blüten von Chelidonium majus und Spartium junceum und bei den rötlichen Kristallen in der Blüte von Asclepias curassavica und in den Blättern von Aglaonema commutatum, Calceolaria rugosa, Chelidonium majus, Dendrobium thyrsiflorum und Urtica dioica der Fall ist. In anderen Fällen konnte ich überhaupt keine Färbung beobachten; selbst nach 24 Stunden hatten die Kristalle noch ihre ursprüngliche Farbe beibehalten. Ich konnte das bei den orangefarbigen Kristallaggregaten in der Blüte von Dendrobium thyrsiflorum, den orangeroten Kristallplättchen in den Früchten von Solanum Lycopersicum, Solanum Dulcamara und Aglaonema commutatum, den orangegelben Kristallaggregaten in dem Arillus von Evonymus latifolius, den roten Kristallplättchen in dem Kelch von Eranthis hyemalis und den orangefarbigen (106) und gelben (210) Kristallaggregaten in der Blüte von Tulipa Gesneriana feststellen. In allen diesen Fällen kommen neben Kristallen, die sich gar nicht oder

nur langsam färben, auch Kristalle vor, die sich sofort färben. Wie aus obigem hervorgeht, ist Jodjodkaliumlösung in vielen Fällen ein geeignetes Mittel, um verschiedene Carotinoide zu unterscheiden.

Die Objekte, an denen ich die Jodreaktion studierte, waren dieselben, bei welchen ich die Bromreaktion beobachtete.

Neue Reagenzien für Carotinoide.

Nicht allein mit Schwefelsäure, sondern auch mit verschiedenen anderen Reagenzien gelingt es, Carotinoide bleibend blau zu färben, nämlich mit Selensäure und mit gesättigten Lösungen von Antimonchlorür, Zinkchlorid und Aluminiumchlorid in Salzsäure von 25 oder 38% und wahrscheinlich kann man noch mehr solche Reagenzien finden.

Selensäure. Mit Selensäure gelang es mir unter anderen bei der Blüte von Narcissus Pseudonarcissus, die mit Hilfe des Molisch'schen Reagenzes ausgeschiedenen Carotinoidkristalle schön blau zu färben. Wenn die Selensäure aus dem Handel zu viel Wasser enthält, muß sie durch Eindampfen konzentriert werden. Die Selensäure ist, so viel ich weiß, noch nicht als mikrochemisches Reagens benützt worden. Ob sie Vorteile über die Schwefelsäure gewährt, kann ich in Rücksicht auf die wenigen Versuche, die ich angestellt habe, nicht sagen.

Antimonchlorür und Zinkchlorid. Das Antimonchlorür und das Zinkchlorid löste ich in 25%iger Salzsäure. Von beiden gebrauchte ich eine gesättigte Lösung. Mit diesen beiden Lösungen, die bis jetzt als Reagenzien für Carotinoide noch nicht benutzt worden sind, gelang es mir bei den Carotinoidkristallen, die in der Natur in den Zellen vorkommen oder künstlich in denselben ausgeschieden worden sind, eine schöne, dunkle, sehr lange bleibende, blaue Farbe hervorzurufen. Die beiden Lösungen prüfte ich in mehr als 40 Fällen. Ich ließ sie unter dem Deckglas zu den Präparaten fließen oder ich brachte sie zu den Präparaten, die sich in einer minimalen Quantität Wasser auf dem Objektträger befanden. Bei Anwendung von Antimonchlorürlösung muß man die Präparate erst in Salzsäure bringen, um Entstehung des im Wasser unlöslichen Antimonoxychlorürs vorzubeugen. Bei Anwendung von Zinkchloridlösung ist die vorhergehende Übertragung in Salzsäure nicht unbedingt notwendig.

Bei allen Kristallen tritt die Reaktion nicht gleich schnell ein. Die orangegelben und orangenen Kristalle färben sich eher blau als die orangeroten, roten und rotvioletten. Mit Chlorzinklösung nehmen die orangeroten, roten und rotvioletten Kristalle bei der gewöhnlichen

Temperatur nicht immer eine blaue Farbe an. In vielen Fällen habe ich mich überzeugt, daß eine schwache Erwärmung auf dem Objektträger über eine Mikroflamme ausreicht, um die Reaktion doch hervorzurufen. Bei Anwendung von Antimonchlorürlösung färben sich bei der gewöhnlichen Temperatur schließlich immer alle Kristalle blau. Als allgemeines Reagens für Carotinoide kann ich die Antimonchlorürlösung sehr empfehlen. Besonders zeigte sich das bei der Untersuchung kleiner Objekte und bei der Anwesenheit von wenig Carotinoid.

Die Farbe, welche die beiden Lösungen hervorrufen, ist meist rein blau (Kl. et V. 426), beim Anfang der Einwirkung manchmal blauviolett (476, 451). Bisweilen zeigen sich, wie bei der Anwendung konzentrierter Schwefelsäure, Nebenerscheinungen, wie Verflüssigung der gebildeten Kristalle zu blau gefärbten Tropfen, Auflösung der Kristalle oder Tropfen und Ausscheidung von sehr kleinen blauen Tröpfchen aus der Lösung.

Wenn man die durch Antimonchlorür oder Zinkchlorid blau gefärbten Kristalle hintereinander mit verdünnter Salzsäure und Wasser abwäscht, so taucht die ursprüngliche orangegelbe oder rote Farbe wieder hervor, wenn auch etwas weniger rein.

Schwefelsäure und Chlorzink greifen in mehr oder weniger konzentriertem Zustand die Zellwände stark an. Mit Antimonchlorürlösung ist das viel weniger der Fall. Dieses ist ein Vorteil bei der Anwendung des letztgenannten Reagenzes.

Die Antimonchlorür- und Zinkchloridlösung habe ich bei den folgenden Objekten geprüft:

Blüten: Asclepias curassavica, Chelidonium majus, Calceolaria rugosa, Calendula arvensis, Cucurbita melanosperma, Dendrobium thyrsiflorum, Doronicum Pardalianches, Ferula sp., Gazania splendens, Hiëraceum aurantiacum, Inula Helenium, Isatis tinctoria, Iris Pseudacoris, Kleinia Galpini, Kerria japonica, Lilium croceum, Narcissus Pseudonarcissus, Narcissus poeticus, Spartium junceum, Thermopsis lanceolata, Trollius caucasicus.

Blätter: Chelidonium majus, Urtica dioica.

Früchte: Aglaonema commutatum, Physalis Francheti (Frucht und Kelch), Solanum Dulcamara, Solanum Lycopersicum, Sorbus aucuparia, Tamus communis.

Arillus: Evonymus latifolius.

Wurzel: Daucus Carota.

Algen: Anabaena sp., Ceramium rubrum, Chlorella protothecoides, Chlorella variegata, Chondrus crispus, Cladophora conglomerata, Cystococcus humicola, Euglena sp., Fucus serratus, Fucus vesiculosus, Haematococcus pluvialis, Laminaria digitata, Laminaria saccharina, Pleurococcus vulgaris, Stichococcus majus.

Fungi: Aspergillus giganteus, Calocera viscosa, Dacryomyces stillatus, Monilia sitophila, Mucor flavus, Sphaerostilbe coccophila.

Die Antimonchlorürlösung habe ich außer den obengenannten Objekten auch noch bei den folgenden geprüft:

Algen: Nodularia sp., Zygnema cruciatum.

Fungi: Discomyces Eppingeri, Torula rubra.

Aluminiumchlorid. Prof. J. Böeseken in Delft machte mich auf Aluminiumchlorid aufmerksam. Genannter Forscher vermutete, daß man auch mit diesem Stoff bei den Carotinoiden eine blaue Farbe hervorrufen könnte. Ich kam zu dem Resultate, daß das in der Tat der Fall war. Jedoch verdient Antimonchlorür und Zinkchlorid den Vorzug. Man muß eine gesättigte Lösung von kristallwasserfreiem Aluminiumchlorid darstellen und für ihre Darstellung als Lösungsmittel konzentrierte Salzsäure (von 37—38%) gebrauchen; weiter muß man die Reaktion durch Erwärmen auf dem Objektträger unterstützen. Auf diese Weise erhielt ich eine schöne Blaufärbung der Carotinoidkristalle und zwar bei allen fünf von mir untersuchten Objekten, nämlich bei den Blüten von Eranthis hyemalis, Lilium croceum, Narcissus Pseudonarcissus und Narcissus poeticus und bei den Arillus von Evonymus latifolius.

Lösungsmittel.

Die Lösungsmittel, die bei der mikroskopischen Untersuchung der Carotinoidkristalle am meisten in Betracht kommen, sind solche, die sich mit Wasser vermischen. Die Präparate kann man dann sofort aus dem Wasser in die Lösungsmittel übertragen oder man kann diese unter dem Deckglas zu den Präparaten fließen lassen, welche sich im Wasser befinden. Lösungsmittel, welche genannter Bedingung entsprechen, sind z. B. Alkohol und Azeton. Weiter kann man eine alkoholische Seifenlösung (Seifenspiritus der Niederländischen Pharmacopee, 4. Ausgabe, ohne Lavendelöl) und 70%ige Chloralhydratlösung anwenden. Mit diesen beiden Lösungen gelang es mir unter anderen bei den Blättern von Urtica dioica festzustellen, daß die orangegelben Kristalle sich schneller lösen als die roten. Die besten Resultate erhielt ich mit Phenollösungen.

Nach Willstätter und Mieg[1]) ist Xanthophyll „spielend" löslich in Phenol. Wenn man unter dem Deckglas verflüssigtes Phenol (10 Gewichtsteile Phenol in losen Kristallen und ein Gewichtsteil Wasser) zufließen läßt, so beobachtet man, daß die orangegelben Kristalle sich gewöhnlich sehr schnell lösen, während das Lösungsmittel sich orangegelb färbt. Der Auflösung geht oft eine Verflüssigung und Bildung orangegelber Kugeln und Massen vorher. Andere Kristalle lösen sich oft gar nicht oder sehr langsam.

Weil durch Wasser verflüssigtes Phenol sich etwas schwer mit Wasser mischt, habe ich für die mikroskopische Untersuchung einem Gemisch von drei Gewichtsteilen Phenol in losen Kristallen und einem Gewichtsteil Glyzerin den Vorzug gegeben. Dieses Gemisch nenne ich der Kürze halber Phenolglyzerin. Die Erscheinungen, die man beobachtet, sind dieselben, aber die Mischung und Auflösung geht schneller vor sich. Mit diesem Lösungsmittel habe ich in gut 70 Fällen die Carotinoidkristalle untersucht, nämlich bei Blüten, Blättern, Früchten, Algen, Fungi usw. Ich bin dabei zu dem Schluß gekommen, daß die Löslichkeit der Carotinoide sehr verschieden ist.

Die gelben und orangegelben Kristalle verschiedener Nuance lösen sich im allgemeinen sehr schnell. Einige orangefarbige Kristalle lösen sich auch bald, z. B. die orangenen (Kl. et V. 102) Kristallnadeln in der Blumenkrone von Lilium croceum und dem Arillus von Evonymus latifolius und die orangefarbigen (126), platten Kristallnadeln, die bei Cucurbita melanosperma sich in der Blumenkrone, besonders in den auf derselben vorkommenden Haren, ausscheiden. Die orangefarbigen (101) Kristallaggregate in der Blüte von Dendrobium thyrsiflorum lösen sich im Vergleich mit den orangegelben Kristallen, die sich auch in derselben ausgeschieden haben, sehr langsam auf. Die orangeroten, roten und violettroten Kristalle lösen sich im allgemeinen gar nicht oder sehr langsam in Phenolglyzerin. Zu dieser Rubrik gehören auch die Carotinkristalle in der Wurzel von Daucus Carota und die Lycopinkristalle in der Frucht von Solanum Lycopersicum, die man beide nach einem Aufenthalt von einigen Tagen in Phenolglyzerin noch zurückfinden kann.

Einzelne Carotinoide, die, in bezug auf die Farbe, zu der letztgenannten Rubrik gehören, machen, was die Löslichkeit in Phenolglyzerin betrifft, eine Ausnahme. In Sphaerostilbe coccophila kommt z. B. ein Carotinoid vor, daß mit Hilfe des Molisch'schen Reagenzes

1) l. c.

sich in violettroten (576) Kristallen ausscheidet, die in Phenolglyzerin sich schnell lösen. In Haematococcus pluvialis findet sich nebst zwei anderen Carotinoiden ein Carotinoid, dem die Alge ihre blutrote Farbe verdankt und unter gewissen Verhältnissen sich als violettfarbige Plättchen ausscheidet, die sich schnell in Phenolglyzerin lösen und das Lösungsmittel dunkel rotviolett färben.

Eine eigentümliche Erscheinung beobachtete ich in einigen Fällen bei orangegelben Kristallen, nämlich bei den Blüten von Narcissus Pseudonarcissus und Isatis tinctoria und auch bei zwei Algen, Cystococcus humicola und Pleurococcus vulgaris. Bald nach der Auflösung der orangegelben Kristalle fand Ausscheidung von mehr rötlich gefärbten Kristallen statt (bei Narcissus orangerot, Kl. et V. 91).

Es erhob sich nun die Frage, ob in den orangegelben Kristallen ein oder zwei Carotinoide vorkommen. Falls die rotfarbigen Kristalle eine Verbindung des orangegelben Carotinoids mit Phenol sind, braucht nur ein Carotinoid anwesend zu sein. Die Erscheinung kann aber auch auf eine andere Weise erklärt werden, nämlich dadurch, daß zwei Carotinoide vorhanden sein könnten. In dem speziellen Teil meiner Abhandlung werde ich bei Narcissus die Erscheinung im einzelnen besprechen.

Obschon ich die Erscheinung nur in vier Fällen beobachtet habe, ist es möglich, daß man sie bei einer Wiederholung meiner Versuche in mehr Fällen sehen würde; dagegen habe ich mich überzeugt, daß sie in vielen Fällen niemals eintritt.

In 10 Fällen habe ich mit wässeriger, gesättigter Phenollösung Versuche angestellt. (Die Löslichkeit von Phenol im Wasser ist ungefähr 1 zu 12½.) Bei den orangegelben Kristallen beobachtete ich oft ein allmähliches Zerfließen zu orangegelben Kugeln, die sich in der wässerigen Phenollösung nicht lösten. In zwei Fällen, nämlich bei Narcissus Pseudonarcissus und Isatis tinctoria schieden sich nach einiger Zeit in vielen dieser Kugeln orangerote Kristalle aus.

Spezieller Teil.

Von den gut 100 Objekten, welche ich untersuchte, werde ich auf den nachfolgenden Seiten einige im besonderen besprechen.

Das Blatt von Urtica dioica L.

Bei der Brennessel haben Willstätter und Mieg[1]) die Begleiter des Chlorophylls genau untersucht. Durch ihre Untersuchungen wissen

1) l. c.

wir, daß in den Brennesselblättern zwei Carotinoide vorkommen, Carotin, identisch mit dem Daucus-Carotin, und Xanthophyll. Genannte Forscher fanden viermal so viel Xanthophyll wie Carotin.

Wenn man die Blätter von Urtica dioica oder Teile derselben in das Molisch'sche Reagens bringt und nach einigen Tagen untersucht, so hat sich in jeder chlorophyllhaltigen Zelle ein Kristallaggregat gebildet. Dasselbe besteht aus kleinen roten Parallelogrammen, welche kleinen Nadeln ähnlich sind, und orangegelben Plättchen, die einige Male länger als breit sind und mehr oder weniger abgerundete Enden zeigen. Bisweilen ragen aus dem Aggregat ein paar orangegelbe, gebogene, fadenförmige Kristalle hervor. Die Aggregate bestehen zum größten Teil aus den orangegelben Kristallen.

Untersucht man die Kristalle mit Reagenzien und Lösungsmitteln, so zeigen sie Unterschiede. Wenn man die Kristalle mit Schwefelsäure von 76% behandelt, färben sie sich schließlich alle blau, jedoch die orangegelben nehmen zuerst die blaue Farbe an, dagegen behalten die roten oft noch lange ihre ursprüngliche Farbe. Die verschiedenen Kristalle kann man dann sehr scharf unterscheiden. Nimmt man anstatt 76%iger Schwefelsäure Schwefelsäure von 66½%, so färben sich nur die orangegelben Kristalle blau. Wenn man Präparate mit den nach der Kalimethode ausgeschiedenen Kristallen auf einen Objektträger in starke Chloralhydratlösung bringt (in 70%ige), so zeigt es sich, daß nach einiger Zeit, z. B. nach 1½ Stunde, die Aggregate sich sehr verändert haben; die orangegelben Kristalle haben sich gelöst und die roten sind zurückgeblieben. Nach 24 Stunden sind letztere noch nicht ganz aus den Präparaten verschwunden.

Mit Seifenspiritus (Pharm. Nederl. Ed. IV, ohne Lavendelöl) zeigt sich auch ein großer Unterschied in Löslichkeit. Nach eintägigem Aufenthalt im Seifenspiritus sind aus den Präparaten die orangegelben Kristalle verschwunden, während die roten noch vorhanden sind.

Mit Phenolglyzerin erhielt ich ein noch besseres Resultat. Läßt man dieses Gemisch unter dem Deckglas zu dem Präparat fließen, so sieht man die orangegelben Kristalle sich schnell lösen, während die roten zurückbleiben; letztere haben sich nach 24 Stunden noch nicht gelöst und scheinen noch unverändert.

Wenn man die Untersuchung der orangegelben und roten Kristalle erleichtern will, so kann man z. B. folgendes Verfahren benutzen: Man legt Stückchen der Blätter in eine 10%ige Oxalsäurelösung und bringt sie danach in das Molisch'sche Reagens. In dem Gewebe bilden sich

dann große rote und orangegelbe Kristallaggregate, welche man leicht mikrochemisch untersuchen kann.

Berücksichtigt man, was Willstätter und Mieg[1]) über Carotin und Xanthophyll geschrieben haben, so muß man annehmen, daß die oben beschriebenen roten Kristalle aus Carotin und die orangegelben aus Xanthophyll bestehen.

Wie bei den Blättern von Urtica dioica habe ich in vielen anderen Fällen, bei Blüten, Blättern und Algen, gelbe, orangegelbe oder orangefarbige und rote oder orangerote Kristalle unterscheiden können. Ihre Form war auch verschieden und bei der Behandlung mit Reagenzien und Lösungsmitteln zeigten sie ähnliche Unterschiede, wie ich sie bei der Brennessel beobachtete. Ich halte es für gewiß, daß in allen diesen Fällen verschiedene Carotinoide nebeneinander in der Pflanze vorkommen. In den meisten Fällen scheinen zwei Carotinoide einander zu begleiten, von denen das eine zu den Carotinen und das andere zu den Xanthophyllen gehört. Wahrscheinlich kommt öfter dasselbe Carotin und dasselbe Xanthophyll nebeneinander vor, aber gewiß ist es, daß oft ein anderes Carotin oder Xanthophyll anwesend ist.

Die Blüte von Dendrobium thyrsiflorum Rchb. fil.

In der Blütenhülle von Dendrobium thyrsiflorum kommen wenigstens zwei Carotinoide vor, von denen das eine sich durch seine Farbe und sein Verhalten Reagenzien gegenüber von vielen anderen Carotinoiden unterscheidet. Nach Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens fand ich in den Zellen verschiedene orangegelbe (Kl. et V. 151) Kristalle, nämlich stark gebogene, fadenförmige Kristalle, und Kristallplättchen, die meist wetzsteinförmig waren, bisweilen zu Aggregaten vereinigt. Weiter fand ich große und kleine Aggregate von lebhaft orangenen (Kl. et V. 101, sich etwas neigend zu orangerot 81), dünnen nadelförmigen Kristallen. Der Unterschied der Farbe ist sehr auffallend. In einigen Zellen findet man besonders die eine, orangegelbe, in anderen die andere, orangene Art von Kristallen.

Die verschiedenen Kristalle verhalten sich Schwefelsäure verschiedener Stärke gegenüber auf ähnliche Weise. Dasselbe gilt von Bromwasser. Jodjodkaliumlösung gegenüber verhalten die Kristalle sich aber sehr verschieden. Mit dieser färben die orangegelben Kristalle sich sofort schön grün. Die orangefarbigen Aggregate nehmen dagegen über-

---

1) l. c.

haupt keine andere Farbe an; selbst nach 24 Stunden haben sie noch ihre ursprüngliche Farbe beibehalten. Der Unterschied der Farbe der Kristalle ist dann sehr auffallend. Durch Antimonchlorür- und Zinkchloridlösung werden die orangegelben Kristalle blau gefärbt, die orangefarbigen erst rotviolett (551), dann blauviolett (476) und schließlich blau.

Phenolglyzerin gegenüber verhalten die Kristalle sich auch sehr verschieden. Wenn man dieses unter dem Deckglas zu den Präparaten fließen läßt, so sieht man alle orangegelben Kristalle sofort zerfließen und gelbe Kugeln bilden, die sich schnell lösen. Von einer Lösung der orangefarbigen Kristallaggregate bemerkt man anfangs nichts. Man sieht sie bisweilen inmitten der gebildeten Kugeln liegen. Später beobachtet man nur orangene Aggregate in einer gelben Flüssigkeit. Allmählich lösen sich auch die orangenen Kristalle. Nach 24 Stunden zeigt es sich, daß sie verschwunden sind.

Auf Grund der verschiedenen Farbe, des verschiedenen Verhaltens Jodjodkaliumlösung gegenüber und der verschiedenen Löslichkeit in Phenol nehme ich an, daß in der Blütenhülle von Dendrobium thyrsiflorum zwei verschiedene Carotinoide vorkommen. Das orangefarbige kommt nicht allgemein im Pflanzenreich vor. Ein Carotinoid, das demselben vollkommen ähnlich ist, habe ich in anderen Objekten nicht gefunden.

Die Blüte von Narcissus Pseudonarcissus L.

Die Blüte von Narcissus Pseudonarcissus mit orangegelber, becherförmiger Nebenkrone gehört allerdings zu den schönsten Objekten für die mikrochemische Untersuchung der Carotinoidkristalle. Wenn man die Nebenkrone in das Molisch'sche Reagens bringt, so bilden die orangegelben Plastiden bald Kugeln oder Massen aus seifenähnlichem Stoffe ohne scharfe Kontur, welche sich schnell lösen. Aus der orangegelben Lösung, die in den Zellen entsteht, scheiden sich bald orangegelbe (Kl. et V. 151) Kristalle aus. Die meisten dieser Kristalle sind verhältnismäßig große Plättchen ohne charakteristische Form. Außer diesen Plättchen kommen oft noch gerade oder mehr oder weniger gebogene, nadelförmige Kristalle vor, die oft zu Aggregaten vereinigt sind.

In der orangefarbigen Nebenkrone einer anderen Varietät von Narcissus Pseudonarcissus fand ich orangegelbe Plastiden und rote nadelähnliche Kristalle und nach Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens orangegelbe (151) plättchen- und nadelförmige Kristalle, welche den oben beschriebenen orangegelben Kristallen völlig ähnlich waren, die schon erwähnten roten (46) nadelähnlichen Kristalle, die sich bei

näherer Betrachtung oft als Parallelogramme mit sehr scharfen Ecken erwiesen und einzelne orangerote (66) Kristallaggregate.

Die Kristalle verhalten sich zu den verschiedenen Carotinoidreagenzien auf die in dieser Abhandlung angegebene Weise. Was die Schwefelsäurereaktion betrifft, bemerke ich, daß die orangegelben Kristalle schon durch 66½%ige Schwefelsäure blau gefärbt werden. In 95%iger Schwefelsäure findet nach der Blaufärbung Auflösung statt. Die roten Kristalle werden durch Schwefelsäure von 76% noch nicht blau gefärbt, wohl durch Schwefelsäure von 85½%; Schwefelsäure von 95% bewirkt Blaufärbung und Auflösung.

Merkwürdig ist das Verhalten der Kristalle zu Phenollösungen. Die orangegelben Kristalle lösen sich in Phenolglyzerin, während die orangeroten keine Veränderung zeigen. Wenn man das Verhalten der orangegelben Kristalle zu Phenolglyzerin näher studieren will, so benutzt man am besten die Varietät, in deren Präparate nur solche Kristalle vorkommen. Man kann dann feststellen, daß aus der erhaltenen Lösung in Phenolglyzerin sich orangerote (Kl. et V. 91) Kristalle ausscheiden, kleine fast rechtwinklige Parallelogramme und kleine Kristallaggregate.

Zu Reagenzien verhalten diese orangeroten Kristalle sich wie Carotinoidkristalle. Was die Schwefelsäurereaktion betrifft, bemerke ich, daß Schwefelsäure von 66½% sofort Blaufärbung hervorruft. Darauffolgende Behandlung mit Wasser bewirkt ein Wiederhervortreten der orangeroten Farbe.

Wenn man die mit dem Molisch'schen Reagens behandelten Präparate in eine gesättigte, wässerige Phenollösung (ein Gewichtsteil Phenol in losen Kristallen in 12 Gewichtsteilen Wasser) bringt, so erfahren die roten Kristalle keine Veränderung, während die orangegelben schnell zerfließen und orangegelbe Tropfen bilden. Allmählich nehmen die meisten dieser Tropfen eine grüne und nachher blaugrüne Farbe an und oft scheiden sich in denselben orangerote (91) Kristalle, einzelne Kristalle oder kleine Aggregate, aus. In Phenolglyzerin lösen sich die Tropfen, während die orangeroten Kristalle zurückbleiben.

Untersucht man Carotinoidkristalle, die man aus verschiedenen Objekten mit dem Molisch'schen Reagens erhalten hat, mit Phenollösungen, z. B. Kristalle aus der Blüte von Clivia miniata, Asclepias curassavica, Dendrobium thyrsiflorum oder aus Brennesselblättern bereitetes Xanthophyll, so beobachtet man bei den orangegelben Kristallen wohl Auflösung in Phenolglyzerin und Verflüssigung zu Tropfen in gesättigter wässeriger Phenollösung, aber keine Ausscheidung von

Kristallen und auch keine Grünfärbung der Tropfen. Nur in ein paar Fällen beobachtete ich Erscheinungen, welche denen von Narcissus ähnlich waren, unter anderen bei der Blüte von Isatis tinctoria. Mit dem Molisch'schen Reagens erhielt ich bei diesem Objekt Ausscheidung von orangegelben und roten Kristallen. Die orangegelben waren meist plättchenförmig, die roten waren es immer und hatten bisweilen Parallelogrammform. In Phenolglyzerin lösten sich die orangegelben schnell auf, während die roten zurückblieben. Aus der Lösung der orangegelben schieden sich bisweilen rötliche Kristallaggregate aus. In wässeriger Phenollösung bildeten alle orangegelben Kristalle Tropfen, von denen einige eine grüne Farbe annahmen und nach einiger Zeit orangerote Kristallaggregate enthielten,

Der Unterschied zwischen den orangegelben Kristallen von Narcissus Pseudonarcissus und Isatis tinctoria besteht hauptsächlich darin, daß bei Narcissus fast alle orangegelben Kristalle sich auf gleiche Weise verhalten, während bei Isatis nach dem Zerfließen in wässeriger Phenollösung nur ein Teil der Tropfen Grünfärbung zeigt und rötliche Kristalle ausscheidet.

Die Frage, wie man bei Narcissus Pseudonarcissus und Isatis tinctoria das eigentümliche Verhalten der Kristalle zu Phenollösungen erklären muß, ist auf mikrochemischem Wege schwer zu lösen. Es ist möglich, daß die neu gebildeten rötlichen Kristalle eine Verbindung des Carotinoids mit dem Phenol sind. Wie diesem auch sei, bin ich doch der Meinung, daß in den orangegelben Kristallen zwei Carotinoide vorkommen und wohl besonders auf Grund des verschiedenen Verhaltens der Kristalle zu Phenollösungen, was bei Isatis am meisten auffällt. Das eine Carotinoid bleibt gelöst, das andere scheidet sich aus.

Die Blüten von Chelidonium majus L. und Spartium junceum L.

In den Blumenblättern von Chelidonium majus befindet sich ein Carotinoid, das große Ähnlichkeit mit dem der Blumenblätter von Spartium junceum zeigt. Mit dem Molisch'schen Reagens gelingt es bei beiden Objekten, die Carotinoide in den Zellen auszuscheiden. Man findet bisweilen feine, mehr oder weniger fadenförmige Ausscheidungen, aber oft auch Kristallplättchen und Aggregate, die aus Kristallplättchen zusammengesetzt sind. Bei Chelidonium haben die Plättchen meist die Form des Durchschnittes einer bikonvexen Linse; sie haben spitze Enden und an einem Ende oft zwei oder drei Spitzen. Bei Spartium sind die Plättchen meist asymmetrisch; die eine Seite ist fast gerade,

die andere krumm und mit einer oder mehreren Buchten versehen. In durchgehendem Lichte zeigen die Kristalle beider Objekte eine orangegelbe (Kl. et V. 151) Farbe und in reflektiertem Lichte eine grüne Fluoreszenz. Nach Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens zeigen die Blumenblätter auf schwarzem Hintergrunde eine grüne Farbe, während sie auf weißem Hintergrund orangegelb aussehen. In keinem der untersuchten Fälle habe ich diese Erscheinung bei den mikroskopischen Präparaten so deutlich wahrgenommen. Bei den orangegelben Kristallen des aus Brennesselblättern bereiteten Xanthophylls beobachtete ich nur eine schwache grüne Fluoreszenz.

Carotinoidreagenzien gegenüber verhalten die Kristalle beider Objekte sich auf gleiche Weise. Durch Schwefelsäure von 66½% z. B. werden sie blau gefärbt; 95%ige Schwefelsäure bewirkt Blaufärbung und Auflösung. Die vorübergehende grünlich blaue Färbung mit Bromwasser ist bei beiden schwach. Durch Jodjodkaliumlösung werden die Kristalle nicht sofort gefärbt; allmählich nehmen sie eine grüne Farbe an. Zu den übrigen von mir benutzten Reagenzien verhalten sie sich, wie Carotinoide überhaupt. In Phenolglyzerin lösen sie sich schnell auf.

Die Farbe und das Verhalten zu Schwefelsäure von 66½% und Phenol zeigen, daß beide Carotinoide zu den Xanthophyllen gehören. Weiter geht aus obigem hervor, daß beide sehr ähnlich sind. Ob in beiden Objekten dasselbe Carotinoid vorhanden ist, kann man natürlich auf Grund mikroskopischer Untersuchungen nicht mit Sicherheit sagen.

Die Zungenblüten von Gazania splendens Hort., Hiëraceum aurantiacum L., Calendula arvensis L. und Doronicum Pardalianches L.

In den Zungenblüten der vier obengenannten Compositae fand ich nach Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens dunkel orangegelbe (Kl. et V. 151) Kristallplättchen und Aggregate solcher Kristallplättchen. Die Kristallplättchen in den verschiedenen Blüten waren einander sehr ähnlich. Bei Gazania splendens waren die Plättchen meist einige Male länger als breit und hatten sie abgerundete Ecken. Bei Hiëraceum aurantiacum waren sie bisweilen kürzer und fand ich auch wetzsteinförmige und ovale Plättchen. Bei Calendula arvensis waren sie länger und bei Doronicum Pardalianches kurz und einigermaßen rhombenförmig mit abgerundeten Ecken. Wahrscheinlich ist die Form der Plättchen von verschiedenen Einflüssen abhängig, wie z. B. von der Form und Größe der Zellen und von der chemischen Natur der fettartigen Substanz der Plastiden, in welcher das Carotinoid gelöst ist und die bei Einwirkung

des Molisch'schen Reagenzes die Bildung von fettähnlichen Kugeln veranlaßt.

Zu Reagenzien und Lösungsmitteln verhalten die Kristallplättchen in den vier Objekten sich auf dieselbe Weise. Durch Schwefelsäure von 66½% werden sie blau gefärbt. In 95%iger Schwefelsäure färben sie sich blau und lösen sich auf. Durch Jodjodkaliumlösung werden sie dunkel gelbgrün (Kl. et V. 258) gefärbt. Die übrigen von mir benutzten Reaktionen kann man in allen Fällen deutlich beobachten. In Phenolglyzerin lösen die Plättchen sich ohne vorhergehende Zerfließung bald auf.

Die übereinstimmende Farbe, das gleiche Verhalten zu Reagenzien und Lösungsmitteln und die Tatsache, daß die vier untersuchten Objekte derselben Familie angehören, weckt die Vermutung, daß darin dasselbe Carotinoid vorkommt. Auf Grund der Farbe, des Verhaltens zu Schwefelsäure von 66½% und der Löslichkeit in Phenol soll man es zu den Xanthophyllen zählen.

Ein zweites Carotinoid habe ich in keiner der vier obengenannten Blüten gefunden.

Die Blüte von Lilium croceum Chaix. und der Arillus von Evonymus latifolius Mill.

Wenn man die beiden obengenannten Objekte mit dem Molischschen Reagens behandelt, scheiden sich bei beiden in den Zellen zahlreiche, dunkel orangene (Kl. et V. 102, etwas neigend zu 101), gerade, nadelförmige Kristalle aus. Zu Reagenzien und Lösungsmitteln verhalten diese sich auf gleiche Weise. Schwefelsäure von 76% färbt sie allmählich schön blau (401, 426); die Farbe ist anfangs grünlich blau. In stärkerer Schwefelsäure tritt die Reaktion schneller ein und findet Auflösung der Kristalle statt. Mit Antimonchlorür- und Zinkchloridlösung tritt Blaufärbung ein; die Farbe ist nicht sofort blau; Nuancen, besonders blauviolett, kann man beobachten. Der Blaufärbung durch Antimonchlorürlösung folgt Zerfließung und Auflösung der Kristalle. Durch Jodjodkaliumlösung werden die Kristalle dunkel gelbgrün gefärbt, durch Salpetersäure und Bromwasser vorübergehend blau. In Phenolglyzerin lösen die Kristalle sich ohne vorhergehende Zerfließung; sie färben das Lösungsmittel orangegelb. In wässeriger Phenollösung (1 zu 12) zerfließen die Kristalle sehr langsam zu orangefarbigen Tropfen. Die Übereinstimmung der Carotinoidkristalle in den beiden Objekten ist so groß, daß die Frage sich erhebt, ob beide dasselbe Carotinoid enthalten.

In dem Arillus von Evonymus latifolius scheidet sich mit Hilfe des Molisch'schen Reagenzes noch ein zweites Carotinoid in der Form von orangeroten (61) Kristallaggregaten aus. Es unterscheidet sich von dem oben besprochenen durch seine Unlöslichkeit in Phenolglyzerin und durch sein Verhalten zu Jodjodkaliumlösung. Nach einem Aufenthalt von 24 Stunden in genannten Lösungen zeigte es sich, daß die Kristalle nicht verändert waren, resp. sich nicht gelöst und ihre ursprüngliche Farbe beibehalten hatten.

Die Frucht von Sorbus aucuparia L.

Die Frucht von Sorbus aucuparia gehört zu den Objekten, bei welchen nach Schimper[1]) der Farbstoff im kristallinischen Zustande in den Plastiden vorkommt; bei genannter Frucht nämlich in der Form von Aggregaten, die aus Kristallnädelchen zuasmmengesetzt sind. Tammes[2]) erwähnt, daß in der Frucht von Sorbus aucuparia rotgelbe, spindelförmige Plastiden vorkommen. Genannte Forscherin sagt, daß in den meisten, der von ihr untersuchten Früchte Farbstoffkristalle vorkommen, aber nicht ob dies bei Sorbus aucuparia auch der Fall ist. Nachdem das Molisch'sche Reagens gut 2 Monate bei der gewöhnlichen Temperatur eingewirkt hatte, fand Tammes rotgelbe, spitze, oft gekrümmte Kristalle, einzeln und in Büscheln.

Ich selbst fand in dem reifen Fruchtfleisch orangegelbe (Kl. et V. 151) Plastiden und in der Schale rote und bisweilen gelbe Kugeln von fettähnlicher Substanz. Die Plastiden waren lang, mehr oder weniger gebogen und hatten spitze Enden. Kristallaggregate habe ich in denselben nicht unterscheiden können.

Nachdem das Molisch'sche Reagens gut 2½ Monat bei der gewöhnlichen Temperatur eingewirkt hatte, fand ich die Plastiden noch zurück. Ihre Farbe war orangerot geworden, aber ihre Form war noch dieselbe geblieben. Inzwischen waren die Carotinoide zum Teil auskristallisiert. Ich beobachtete in den Zellen des Fruchtfleisches orangerote (76) Kristallaggregate und besonders in der Schale rote (21) Kristallplättchen.

Die Beschreibung der Plastiden und Kristalle, welche Tammes gibt, paßt mehr oder weniger sowohl auf die unveränderten Plastiden, als auf die, welche man lange mit dem Molisch'schen Reagens behandelt hat. Deswegen halte ich es für wahrscheinlich, daß bei Aucuparia eine

1) l. c. pag. 127.
2) l. c. pag. 236.

Verwechslung von Plastiden mit Kristallen stattgefunden hat. Die langen, gekrümmten, zugespitzten, orangeroten Körperchen, die ich nach einer Behandlung von 2½ Monaten mit dem Molisch'schen Reagens zurückfand, sind gewiß mehr oder weniger modifizierte Plastiden, aber durchaus keine Kristalle, wie besonders aus folgendem hervorgeht. Bei schwacher Erwärmung unter dem Deckglase, deshalb weit unter 100° C schmelzen die Körperchen sofort zu Kugeln zusammen. Wenn es Kristalle von einem Carotinoid wären, so könnte man solches nicht erwarten, weil die Schmelzpunkte der Carotinoide weit über 100° C liegen. Wie sichs zeigen wird, gilt dies nicht allein für die Carotinoide, welche chemisch genau untersucht sind, sondern auch für die, welche in der Frucht von Sorbus aucuparia vorkommen. Läßt man die Früchte sehr lange in dem Molisch'schen Reagens verweilen, z. B. ein ganzes Jahr, so haben die Plastiden sich ganz aufgelöst. Man findet dann in der Frucht, besonders in der Schale, Kristalle verschiedener Farbe und Form. Ich konnte dreierlei Kristalle beobachten: orangerote (76) in der Form von Kristallaggregaten, selten als feine kristallinische Ausscheidung oder in der Form von manchmal sehr langen Plättchen, rote (21) Plättchen von verschiedener Form, oft beinahe die eines Parallelogrammes ähnlich, aber mit gebogenen Seiten, und in geringerer Quantität orangegelbe (151) Kristalle, unregelmäßige Kristallmassen und einzelne lange Plättchen.

Wie aus obigem hervorgeht, gehört die Frucht von Sorbus aucuparia zu den Objekten, wobei das Molisch'sche Reagens bei der gewöhnlichen Temperatur sehr langsam einwirkt. Deswegen studierte ich auch die Einwirkung bei erhöhter Temperatur. Es zeigte sich, daß nach kurzer Erwärmung in dem Molisch'schen Reagens bis auf 50° C, in viele Zellen die Plastiden schon zu Kugeln ineinander geschmolzen waren und daß nach Erwärmung bis auf 70° C diese Erscheinung allgemein war. Als ich während einiger Tage die Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes auf die früher angegebene Weise durch Erwärmung unterstützte, lösten die Plastiden sich ganz auf und kristallisierten die Carotinoide aus. Nach der Farbe konnte ich wieder dreierlei Kristalle unterscheiden: In der Schale beobachtete ich rote (16, 21, 41) Kristallplättchen, die manchmal beinahe die Form eines Parallelogramms hatten und orangerote (76) Plättchen und Aggregate und im Fruchtfleisch auch lange orangefarbige, orangene oder orangegelbe (131, 141, 151—152) Plättchen und Nadeln, die gerade oder etwas gebogen und bisweilen verzweigt oder gespalten waren.

Die verschiedenen Kristalle zeigten mit den von mir benutzten Reagenzien die schon früher beschriebenen Färbungen. Gewisse Unter-

schiede konnte ich wieder dabei beobachten. Bei den roten trat z. B. die Blaufärbung mit Schwefelsäure nicht so bald ein wie bei den orangefarbigen. Die roten und orangeroten sind in Phenolglyzerin unlöslich; die orangefarbigen oder orangegelben lösen sich, aber die Auflösung geht oft sehr langsam vor sich.

Wenn ich Präparate mit Carotinoidkristallen bis auf 150° C (nicht korr.) in einem zugeschmolzenen Röhrchen mit Wasser in einem Ölbade erhitzte, so konnte ich die Kristalle unverändert zurückfinden. Nach Erwärmung bis auf 175° C (nicht korr.) zeigte es sich, daß sie zu Kugeln zusammengeschmolzen waren. Wie oben erwähnt, liegen deshalb die Schmelzpunkte der Carotinoide in der Frucht von Sorbus aucuparia weit über 100° C.

In der Frucht von Sorbus Aria Crantz kommen Plastiden, welche den oben besprochenen von Sorbus aucuparia ähnlich sind, vor. Nach sehr langer Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes, nämlich während 15 Monate, fand ich in der Fruchtwand dreierlei Kristalle: dünne, orangerote (71) Plättchen von verschiedener Form, bisweilen parallelogrammähnlich, orangefarbige (101, 102) Kristallbündel und orangegelbe (151) Kristallmassen.

Die Früchte von Solanum Lycopersicum Trn., Solanum Dulcamara L., Aglaonema commutatum Schott. und Tamus communis L.

Den Farbstoff der Tomate, der Frucht von Solanum Lycopersicum, hat man schon zu wiederholten Malen untersucht. Millardet[1]) (1876) sonderte zuerst den Farbstoff ab, den er Solanorubin nannte. Mehrere Forscher, Arnaud[2]), Passerini[3]), Kohl[4]) und Tammes[5]) hielten ihn für identisch mit dem Carotin aus der Wurzel von Daucus Carota. Schunck[6]) gelangt zu dem entgegengesetzten Resultate und nannte den Farbstoff Lycopin. Auf Grund der Untersuchungen von Willstätter und Escher[7]), die den Namen Lycopin übernahmen, darf man es für

---

1) Siehe Richard Willstätter und Heinr. H. Escher, l. c. pag. 47.

2) A. Arnaud, Recherches sur la composition de la carotine usw. Comptes rendus 1886, T. CII, I, pag. 1119.

3) Siehe Richard Willstätter und Heinr. H. Escher, l. c. pag. 47.

4) l. c. pag. 74.

5) l. c. pag. 237 u. 244.

6) C. A. Schunck, The Xanthophyll group of yellow colouring matters. Proc. Roy. Soc. 1903, T LXXII, pag. 165.

7) l. c.

bewiesen halten, daß die beiden Farbstoffe nicht identisch sind. Letztgenannte Forscher fanden, daß Lycopin dieselbe empirische Formel hatte wie Carotin, nämlich $C_{40}H_{56}$. Beide Stoffe sind deshalb isomer. Bei mikroskopischer Untersuchung zeigen beide Stoffe nebst Punkte von Übereinstimmung auch deutliche Unterschiede; die Farbe der Kristalle und die Reaktion mit Bromwasser sind verschieden.

Lycopin hat man bis jetzt nur in der Tomate gefunden. Unter den von mir untersuchten Objekten fand ich drei Früchte, welche Farbstoff enthielten, der so große Ähnlichkeit mit dem Lycopin zeigte, daß die Frage sich erhob, ob die Farbstoffe dieser Früchte mit dem Lycopin identisch seien. Es sind die Früchte von Solanum Dulcamara, Aglaonema commutatum und Tamus communis.

Nach den Untersuchungen von Schimper[1]) und Courchet[2]) hat bei der Tomate das Lycopin sich in den Plastiden kristallinisch ausgeschieden, und zwar in der Form von röhrenförmigen Kristallen. Schimper hat uns auf die Ähnlichkeit dieser Kristalle mit denen in der Wurzel von Daucus Carota aufmerksam gemacht, wo nebst parallelogrammförmigen Kristallplättchen auch röhrenförmige Körperchen vorkommen.

In der Tomate beobachtete ich auch diese eigentümlichen Körperchen; es waren verhältnismäßig lange, rollenförmige, oft zugespitzte Röhrchen. Auch in den Früchten von Aglaonema commutatum und Tamus communis fand ich ähnliche röhrenförmige Körperchen. In der Frucht von Solanum Dulcamara kommen keine Röhrchen vor, sondern die Plastiden enthalten da sehr kleine Körperchen, deren Form schwer zu bestimmen ist.

Die Farbe der eigentümlichen Körperchen und der Plastiden in den vier obengenannten Früchten ist verschieden; bei Solanum Lycopersicum und Solanum Dulcamara ist sie rotviolett, bei Aglaonema commutatum orangerot und bei Tamus communis orange. Nebst Lycopin kommen in allen vier Früchten ein oder mehrere andere Carotinoide vor; daher ist die Farbe nicht dieselbe.

Ob bei den vier obengenannten Objekten die Carotinoide in der Tat in der Form von Kristallen vorkommen, wie Schimper, Courchet und andere Forscher meinen, ist schwer zu entscheiden. Zwei Fragen erhoben sich, nämlich: ob man die Röhrchen anstatt gewöhnlicher Kristalle nicht vielmehr als organische Bildungen betrachten muß, und ob die Röhrchen ausschließlich aus Carotinoid bestehen. Wie ich unten besprechen

1) l. c. pag. 96.
2) l. c. pag. 301.

werde, gelang es mir in allen vier Fällen, aus den Plastiden oder aus den aus diesen entstandenen Röhrchen die Carotinoide in der Form von deutlichen Kristallplättchen abzusondern. Wenn in der Tat schon reine Carotinoidkristalle vorlagen, würde eine derartige Umkristallisation sehr wahrscheinlich nicht stattgefunden haben.

Bemerkenswert ist das verschiedene Verhalten der Carotinoide zu dem Molisch'schen Reagens. Wenn dieses bei der gewöhnlichen Temperatur einwirkt, bleiben bei der Tomate die röhrenförmigen Gebilde in den Zellen zurück. Es zeigt sich, daß dieselben ihre ursprüngliche Form beibehalten haben. Ihre Farbe ist rotviolett (Kl. et V. 586). Außer diesen aus Lycopin bestehenden Gebilden befinden sich im Gewebe noch große orangerote (61, 76) sechsseitige Plättchen mit stumpfen und ungefähr rechten Winkeln. Sie kommen in geringer Anzahl an beliebigen Stellen im Gewebe vor. Sie sind nicht, wie die rotvioletten röhrenförmigen Gebilde schon in dem lebenden Objekt anwesend, sondern sie haben sich während der Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes ausgeschieden. Die Tomate enthält deshalb außer dem Lycopin noch ein zweites Carotinoid.

Bei Sonalum Dulcamara erleiden die violettroten (586) Körperchen der Plastsiden bei der gewöhnlichen Temperatur in dem Molisch'schen Reagens keine wahrnehmbare Änderung. Trotzdem bilden sich während der Einwirkung des Reagenzes dünne violettrote parallelogrammförmige Kristallplättchen nebst einigen großen orangeroten (61) plättchenförmigen Kristallen mit stumpfen und fast rechten Winkeln, wie ich sie auch bei der Tomate antraf.

Bei Aglaonema commutatum und Tamus communis findet man nach der Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens bei gewöhnlicher Temperatur die röhrenförmigen Gebilde in den Zellen zurück. Ihre Farbe ist in beiden Fällen dann rotviolett (586). Bei Tamus communis findet man außerdem an beliebigen Stellen im Gewebe noch orangerote (81) Kristallmassen und orangegelbe (151) Kristallaggregate.

Wie aus obigem hervorgeht, löst das rotviolette Carotinoid während der Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes bei gewöhnlicher Temperatur sich nicht auf, und unterscheidet sich dadurch von den anderen Carotinoiden, die sich lösen und wandern, bevor sie auskristallisieren. Nur bei Solanum Dulcamara löst sich etwas rotviolettes Carotinoid, das sich darauf in der Form von kleinen, dünnen Parallelogrammen ausscheidet.

In allen vier Fällen habe ich auch untersucht, welche Resultate man erhält, wenn man auf die früher angegebene Weise die Objekte lange

mit dem Molisch'schen Reagens bis auf 80° C erwärmt. Bei Solanum Lycopersicum, Aglaonema commutatum und Tamus communis fand ich anstatt der röhrenförmigen Gebilde sehr kleine rotviolette Plättchen von unbestimmter Form. Bei Solanum Dulcamara fand ich nebst den kleinen rotvioletten Körperchen aus den Plastiden wieder dünne kleine rotviolette Parallelogramme. Bei Solanum Lycopersicum, Solanum Dulcamara sowie auch jetzt bei Aglaonema commutatum beobachtete ich an beliebigen Stellen im Gewebe große orangerote (61) plättchenförmige Kristalle mit stumpfen und fast rechten Winkeln.

Weil nach meiner Meinung keine genügenden Gründe vorlagen um anzunehmen, daß die röhrenförmigen Gebilde bei Solanum Lycopersicum, Aglaonema commutatum und Tamus communis sich gelöst hatten und die kleinen rotvioletten Plättchen auskristallisiert waren und keine Stücke der Röhrchen waren, versuchte ich auf andere Weise das rotviolette Carotinoid auskristallisieren zu lassen.

Weil es sich während der Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens weniger löslich als andere Carotinoide zeigte, meinte ich, daß stärkere Erwärmung und langsamere Einwirkung des Kaliumhydroxyds auf die Stoffe, welche die Carotinoide festhalten, vielleicht zu besseren Resultaten führen könnte. Darum erwärmte ich die Objekte bis auf 140° C (unkorr.) in einer 10%igen Lösung von Kaliumhydroxyd in Glyzerin mit Hilfe eines Ölbades. Die Temperatur blieb deshalb bedeutend unter dem Schmelzpunkt des Lycopins zurück. In allen vier Fällen beobachtete ich nach nicht sehr langer Erwärmung, daß sich Schmelzungsprodukte gebildet hatten, nämlich rotviolette Kugeln. Destomehr diese zersetzt und gelöst wurden, kristallisierte das Carotinoid aus; schließlich hatten sich zahlreiche Carotinoidkristalle in den Zellen gebildet. Es waren mehr oder weniger stark rotviolette (Kl. et V. 581, 586, 591, 596, bei Solanum Dulcamara außerdem 576, 577, 578, 582) Plättchen von verschiedener Dicke, Länge und Breite. Bisweilen waren sie langen Nadeln ähnlich. Die Längsseiten waren parallel; die Ecken waren oft abgerundet. Zur völligen Entwicklung gelangte Plättchen waren meistens parallelogrammförmig, selten rautenförmig. In allen vier obengenannten Objekten zeigten die Kristalle dieselbe Farbe und Form. Bei der Tomate gelang die Ausscheidung von ähnlichen Kristallplättchen schon durch lange dauernde Erwärmung in Glyzerin bis auf 140° C. Nach der Erwärmung in Glyzerin oder in Glyzerin mit Kaliumhydroxyd beobachtete ich nur Kristalle des rotvioletten Carotinoids. Andere Carotinoide schieden sich nicht kristallinisch aus.

Die Kristalle des rotvioletten Carotinoids, sowohl die durch Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens wie die mit Hilfe von Glyzerin oder von Glyzerin und Kaliumhydroxyd erhaltenen, untersuchte ich mit verschiedenen Reagenzien und Lösungsmitteln. Es zeigte sich dabei, daß ihr Verhalten zu denselben vollkommen dasselbe war.

Schwefelsäure von 85½% färbt die Kristalle schön blau. Schwefelsäure von 76% ruft die Reaktion, falls sie eintritt, nur langsam und manchmal weniger stark hervor. Mit Schwefelsäure von 95% wird die Blaufärbung bald durch eine Zusammenfließung und Auflösung gefolgt. Chlorzinklösung bewirkt bei der gewöhnlichen Temperatur allmählich und unter schwacher Erwärmung sofort eine Blaufärbung. Antimonchlorürlösung färbt die Kristalle bald blau, worauf sie zu blauen Tropfen zusammenfließen. Salpetersäure verursacht vorübergehende Blaufärbung. Eigentümlich sind die Nuancen, die sich während der Behandlung mit Bromwasser zeigen. Die ursprüngliche rotviolette (586) Farbe der Kristalle wandelt sich in lebhaft blauviolett (476) um; darauf werden die Kristalle blaugrün (386), grün, gelblich und schließlich farblos. Wenn das Bromwasser langsam zufließt, kann man bei demselben Präparat alle Nuancen zugleich beobachten. Der Farbenwechsel ist sehr charakteristisch. Bei anderen Carotinoiden habe ich einen derartigen niemals wahrgenommen. Durch Jodjodkaliumlösung werden die Kristalle sofort dunkel gelbgrün gefärbt. In Phenolglyzerin sind sie fast unlöslich. Wenn die Präparate während einiger Tage auf einem Objektträger in Phenolglyzerin gelegen haben, kann man erst feststellen, daß Auflösung angefangen hat.

Die Carotinoide, welche nebst dem rotvioletten Carotinoid in den vier untersuchten Früchten vorkommen, unterscheiden sich von diesem außer durch die Farbe noch in anderen Hinsichten. Bei Tamus communis lösen sich die Carotinoide, ausgenommen das rotviolette, in Phenolglyzerin. Bei Solanum Lycopersicum, Solanum Dulcamara und Aglaonema commutatum wird das orangerote Carotinoid im Gegensatz zu dem rotvioletten durch Jodjodkaliumlösung nicht gefärbt.

Auf Grund der Übereinstimmung, betreffs Farbe, Kristallform, Verhalten zu Reagenzien, Lösungsmitteln und Mitteln, welche dienen, um die Carotinoide in Kristallform auszuscheiden, vermute ich, daß die rotvioletten Carotinoide in den Früchten von Solanum Dulcamara, Aglaonema commutatum und Tamus communis mit dem Lycopin in der Frucht von Solanum Lycopersicum identisch sind. Makrochemische Untersuchungen werden uns hierüber Gewißheit verschaffen müssen. Überdies bin ich zu dem Resultate gelangt, daß in den Früchten von So-

lanum Lycopersicum, Solanum Dulcamara und Aglaonema commutatum noch ein zweites Carotinoid und in der Frucht von Tamus communis noch zwei andere Carotinoide vorkommen. Auch in der Tomate, in welcher Frucht bis jetzt nur Lycopin gefunden ist, kommt deshalb ein zweites Carotinoid vor, sei es auch nur in geringer Quantität.

Haematococcus pluvialis Flot.

Der Farbstoff dieser interessanten Alge ist von Zopf[1]) untersucht worden. Das Resultat seiner Untersuchungen war, daß sie nicht ein, sondern zwei Farbstoffe enthielt, die zu den Carotinoiden gehörten. Nach Zopf kommt ein gelbes Carotinoid vor, wie es allgemein bei chlorophyllhaltigen Pflanzen der Fall ist, und ein rotes, dem die Alge ihre dunkel blut- oder braunrote Farbe und ihren Namen zu danken hat. Es gelang ihm, die beiden Farbstoffe auf die folgende Weise zu trennen: Der rohe alkoholische Extrakt der Alge wurde mit Natronlauge verseift. Das Chlorophyll wurde hierbei in eine Natriumverbindung übergeführt, das Fett in fettsaures Alkali und Glyzerin; das gelbe Carotinoid wurde frei gemacht und das rote wandelte sich in eine im Wasser unlösliche Natriumverbindung um. Wenn die mit Wasser verdünnten Verseifungsprodukte mit Petroläther behandelt wurden, löste sich darin das gelbe Carotinoid, während die Natriumverbindung des roten sich ausschied. Nach Reinigung der Natriumverbindung wurde das rote Carotinoid durch verdünnte Schwefelsäure freigemacht, in Äther gelöst und spektroskopisch untersucht. Das rote Carotinoid unterschied sich vom gelben, was seine Farbe und die Farbe seiner Lösungen betraf, spektroskopisch und dadurch, daß es mit Alkalien und alkalischen Erden Verbindungen einging.

Haematococcus pluvialis ist auch von Jacobsen[2]) untersucht worden. Mit Hilfe der Molisch'schen Kalimethode erhielt dieser Forscher Ausscheidung von Kristallen, dagegen nicht mit verdünnten Säuren und auch nicht mit der Tswett'schen Resorzinlösung. Von Herrn Jacobsen empfing ich eine Kultur von Haematococcus pluvialis auf Agar Agar, wodurch mir die Gelegenheit verschafft wurde, diese merkwürdige Alge zu untersuchen. Die obenerwähnten Resultate von Jacobsen konnte ich bestätigen. Wie auch aus seinen Abbildungen hervorgeht, sehen die Aplanosporen, was ihre Farbe betrifft, sehr verschieden aus;

---

1) W. Zopf, Cohn's Hämatochrom ein Sammelbegriff, l. c. pag. 417.
2) l. c. pag. 24ff.

bei einigen sieht der Inhalt wegen des Chlorophylls grün aus; bei anderen ist der Inhalt nur an der Peripherie grün und im Zentrum rot und bei wieder anderen ist die grüne Farbe des Chlorophylls ganz verdeckt und scheint nur roter Inhalt anwesend zu sein. Der rote Farbstoff ist an flüssiger fettartiger Substanz gebunden oder eigentlich darin aufgelöst. Diese kommt in der Form von Tropfen in dem Inhalt vor.

Wie ich erwarten konnte, führt die Untersuchung der Aplanosporen, welche betreffs der Farbe verschieden aussehen, zu verschiedenen Resultaten. Bei den grünen gelingt es mit dem Molisch'schen Reagens bald Ausscheidung von orangegelben Kristallen zu bekommen; meistens bilden diese gebogene Nadeln, die oft bündelweise vereinigt sind, bisweilen auch orangegelbe Kristallplättchen. Außer diesen Plättchen kommen auch einige kleine, rote, parallelogrammförmige Plättchen vor. Wenn man Schwefelsäure von 66½ oder 76% zufügt, so werden die orangegelben Kristalle blau gefärbt, ohne daß darauf Zusammenfließung zu Kügelchen oder Auflösung stattfindet, was bei Anwendung von 95%-iger Schwefelsäure wohl der Fall ist. Die kleinen, parallelogrammförmigen, roten Kristalle werden durch Schwefelsäure nicht so bald blau gefärbt wie die orangegelben. Um die roten Kristalle blau zu färben, braucht man stärkere Schwefelsäure als für die Blaufärbung der orangegelben. Auch zu Phenolglyzerin verhalten die Kristalle sich verschieden. Die orangegelben lösen sich darin bald auf, während die roten ungelöst zurückbleiben. Die orangegelben verhalten sich deshalb wie Xanthophyllkristalle und die roten wie Carotinkristalle. Als Begleiter des Chlorophylls kommen in den grünen Aplanosporen zwei Carotinoide vor, ein orangegelbes und in geringerer Quantität ein rotes, wie es bei chlorophyllhaltigen Pflanzen und Pflanzenteilen allgemein der Fall ist.

In den mehr oder weniger rotfarbigen Aplanosporen findet man nach der Behandlung mit dem Molisch'schen Reagens rotviolette Kristallaggregate und oft rotviolette, gebogene, bandförmige Kristalle. Die kleinen, parallelogrammförmigen, roten Kristalle lasse ich jetzt weiter außer Betracht. Die Kristallausscheidung geht in den rotfarbigen Aplanosporen nicht so schnell vor sich wie in den grünen. Wünschenswert ist es, daß das Molisch'sche Reagens wenigstens einige Tage einwirkt, um die fettartige Substanz, welche den Farbstoff festhält, zu zersetzen. Bleibt diese Substanz zurück, so wird die weitere Untersuchung dadurch erschwert.

Schwefelsäure von 66½% färbt die rotvioletten Kristalle blau; dieses ist auch mit 76%iger Schwefelsäure der Fall, aber die Einwirkung ist dann mit einer beginnenden Lösung verbunden und bisweilen auch

mit einer dieser vorhergehenden Zusammenfließung. Die umgebende Flüssigkeit färbt sich dabei blau. Aus obigem geht hervor, daß die rotvioletten Kristalle zu Schwefelsäure verschiedener Stärke sich auf etwas andere Weise verhalten wie die orangegelben. In Phenolglyzerin lösen die rotvioletten Kristalle sich schnell auf; das Lösungsmittel färbt sich dabei dunkel rotviolett.

Die Farbe der Kristalle war nicht ausschließlich orangegelb oder rotviolett, sondern oft schwankte sie dazwischen. Niemals beobachtete ich orangegelbe und rotviolette Kristalle in einer Spore nebeneinander. Auf Grund dieser Tatsachen und der Löslichkeit in 76%iger Schwefelsäure vermutete ich, daß die rotvioletten Kristalle aus zwei Carotinoiden bestanden. Ich versuchte durch Lösungsmittel beide zu trennen, was mir gelang. Die Kristalle lösen sich in Azeton und absolutem Alkohol oft ganz auf. Das orangegelbe Carotinoid bleibt gelöst, aber das andere scheidet sich wieder bald in den Sporen aus und bildet zahlreiche violette Plättchen. Den Versuch kann man in einem Probiergläschen und auf dem Objektträger anstellen. Im letzten Fall kann man die Auflösung der Kristalle, die Gelbfärbung der Flüssigkeit in und außer den Sporen und die Ausscheidung der violetten Plättchen unter dem Mikroskop beobachten.

Die obenerwähnten Erscheinungen lassen sich auf die folgende Weise erklären. Das orangegelbe Carotinoid ist in Azeton und absolutem Alkohol löslich; das andere ist so gut wie unlöslich, aber bei Anwesenheit des orangegelben ist es leichter löslich. In den Sporen entsteht eine Lösung beider Carotinoide, welche bald verdünnt wird. Demzufolge scheidet das in Azeton und Alkohol unlösliche Carotinoid sich aus. Eine Beobachtung von Zopf[1]) verstärkt diese Vermutung. Als dieser Forscher der wässerigen Lösung der Verseifungsprodukte mit Petroläther das gelbe Carotinoid entzog, schied das andere sich unter dem Petroläther aus.

Die violetten Plättchen zeigten keine bestimmte Form. Zu Reagenzien und Lösungsmitteln verhalten sie sich auf die folgende Weise: Durch Schwefelsäure von 66½% wird ihre Farbe gar nicht oder nur wenig modifiziert, aber 76%ige Schwefelsäure färbt die Kristalle bald blau und löst sie schnell auf. Zinkchlorid- und Antimonchlorürlösung bewirken Blaufärbung der Plättchen; gewöhnlich zerfließen diese zu blauen Kügelchen und schließlich lösen sie sich auf. Die Lösungen zeigen eine blaue oder blauviolette Farbe. Bromwasser ruft eine schnell ver-

1) l. c. pag. 419.

schwindende blaugrüne Farbe hervor. In Phenolglyzerin lösen die Plättchen sich; das Lösungsmittel färbt sich dabei stark rotviolett.

Vergleicht man die violetten Plättchen aus Alkohol oder Azeton mit den rotvioletten und orangegelben Kristallen, die während der Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes in roten und grünen Aplanosporen entstehen, so zeigt es sich, daß die Eigenschaften der rotvioletten Kristalle die Mitte halten zwischen denen der orangegelben und violetten, was mich in der Vermutung, daß in den rotvioletten zwei Carotinoide vorkommen, bestärkt.

Ich bemerke, daß nach Zopf[1]) das violettrote oder blutrote Carotinoid mit Kaliumhydroxyd eine Verbindung eingeht. Auf Grund dieser Ansicht würde man annehmen müssen, daß die rotvioletten Kristalle, welche sich aus dem Molisch'schen Reagens ausscheiden, die Kaliumverbindung des Carotinoids enthalten und die Kristalle, welche sich aus Azeton oder Alkohol ausscheiden, aus genannter Kaliumverbindung bestehen. Bei der mikroskopischen Untersuchung habe ich aber dafür keine Anhaltspunkte gefunden. Ließ ich die violetten Plättchen aus Azeton oder Alkohol während 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur in verdünnter Schwefelsäure verweilen, so hatten sie sich nicht verändert und ihre Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln war noch dieselbe. Wie dem auch sei, hierin stimmen die Resultate von Zopf und die meinigen miteinander überein, daß bei Haematococcus pluvialis mehr als ein Carotinoid vorkommt, nach Zopf nämlich zwei, während es mir gelang, drei in den Zellen auskristallisieren zu lassen und jedes von den beiden anderen zu trennen.

Schließlich mache ich ein paar Bemerkungen zu der Kultivierung von Haematococcus pluvialis in verschiedenen Lösungen und zu der Untersuchungsmethode. Ich kultivierte die Alge in zwei verschiedenen Lösungen, nämlich in: KNO_3 0,01, $(NH_4)_2HPO_4$ 0,01, $MgCl_2$ 0,01, Na_2SO_4 mit Kristallwasser 0,01, H_2O 100 und NH_4NO_3 0,02, K_2HPO_4 0,02, $MgSO_4$ 0,02, H_2O 100[2]). In ersterer Lösung erhielten die meisten Aplanosporen einen grünen Inhalt, in letzterer einen roten, wodurch die Untersuchung erleichtert wurde. Bei der Übertragung von Haematococcus aus der einen Flüssigkeit in die andere und beim Auswaschen der Alge, wendete ich Zentrifugieren an. Das Untersuchungsmaterial setzt sich und die Flüssigkeit kann abgegossen werden.

---

1) l. c. pag. 419.
2) H. C. Jacobson, l. c. pag. 8.

Fungi.

Wie früher erwähnt, hat Zopf[1]) schon bei mehreren Fungi Carotinoide gefunden. Selbst untersuchte ich 34 Fungi. Es zeigte sich dabei, daß in ungefähr 10 derselben größere oder kleinere Quantitäten von Carotinoiden vorkommen. Wenn man berücksichtigt, daß ich nur farbige Fungi untersuchte, besonders gelbe, orangene und rote, so geht daraus hervor, daß Carotinoide verhältnismäßig selten bei Fungi vorkommen.

Bei Calocera viscosa erhielt ich mit dem Molisch'schen Reagens zwischen den Hyphen eine reichliche Ausscheidung von lebhaft orangenen (Kl. et V. 61) Kristallen, welche stäbchenförmig waren und oft Aggregate bildeten. Diese Kristalle zeigten mit Schwefelsäure, Salpetersäure, Bromwasser, Jodjodkaliumlösung, Antimonchlorür- und Zinkchloridlösung die für die Carotinoide charakteristischen Reaktionen. Schwefelsäure von 66½% färbte die Kristalle allmählich blau; 76%ige Schwefelsäure bewirkte sofort Blaufärbung; 85½%ige Blaufärbung, Zusammenfließung und Auflösung und 95%ige Blaufärbung und schnelle Auflösung. In Phenolglyzerin lösen die Kristalle sich allmählich. Bei Calocera cornea und Calocera palmata schieden sich während der Einwirkung des Molischschen Reagenzes ähnliche Kristalle aus.

Bei Dacryomyces stillatus scheiden sich während der Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes einzelne Kristalle und Kristallaggregate aus, welche den bei Calocera gefundenen völlig ähnlich sind und sich zu Reagenzien und Phenolglyzerin auf ähnliche Weise verhalten. Außer diesen Kristallen fand ich rötliche (22), die eine andere Form hatten und durch Schwefelsäure etwas schneller blau gefärbt wurden. Auch beobachtete ich noch orangegelbe (126) Aggregate. Bei Dacryomyces stillatus kommen deshalb mehrere Carotinoide vor.

Bei Monilia sitophila, Nectria cinnabarina und Torula rubra gelang es mit Hilfe des Molisch'schen Reagenzes rote Kristalle auszuscheiden und bei Aspergillus giganteus und Mucor flavus erhielt ich damit eine orangegelbe Ausscheidung. Auch in diesen fünf Fällen erhielt ich mit Reagenzien die in dieser Abhandlung besprochenen Carotinoidreaktionen.

Bei Sphaerostilbe coccophila, die eine orangerote (81) Farbe hat, kommen im Zellinhalt rotfarbige fettähnliche Kügelchen vor. Während der Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes scheiden sich zwischen den Hyphen sehr viele violettrote (576) Kristalle ab, nämlich Plättchen und gebogene Nadeln, als einzelne Kristalle und in Aggregaten. Mit

1) Zur Kenntnis der Färbungsursachen niederer Organismen, l. c.

76%iger Schwefelsäure tritt Blaufärbung ein; mit stärkerer Schwefelsäure auch Zerfließung und Auflösung. Mit Salpetersäure, Bromwasser, Jodjodkaliumlösung, Antimonchlorür- und Zinkchloridlösung erhält man die beschriebenen Carotinoidreaktionen. In Phenolglyzerin findet sofort Auflösung statt. In dieser Hinsicht ist das bei Sphaerostilbe gefundene Carotinoid von anderen Carotinoiden, welche auch zu den rotfarbigen gehören, verschieden.

Schließlich bemerke ich, daß es möglich ist, daß einige der untersuchten Fungi, bei denen die Untersuchung zu einem negativen Resultate führte, doch in geringer Masse Carotinoid enthalten, denn in ein paar Fällen, nämlich bei Discomyces Eppingeri und Torula cinnabarina erhielt ich z. B. mit Antimonchlorürlösung Blaufärbung, obschon es nicht gelungen war, Kristalle auszuscheiden.

Zusammenfassung der Resultate.

Für die Ausscheidung von Carotinoiden in Kristallform in der Pflanze sind verschiedene Methoden empfohlen worden. Die Kalimethode von Molisch mit einer Lösung von Kaliumhydroxyd in verdünntem Alkohol (20 Gewichtsprozent KOH und 40 Volumenprozent Alkohol) ist die wichtigste. Sie läßt den Forscher fast niemals im Stiche. Ist das der Fall, so kann man versuchen die Einwirkung des Molisch'schen Reagenzes durch Erwärmung bis auf 70—80° C zu befördern. Diese Modifikation führt in mehreren Fällen, in welchen die Kalimethode bei der gewöhnlichen Temperatur versagt oder sehr viel Zeit erfordert, zu guten Resultaten.

Bei der Untersuchung nach der Lokalisation muß man berücksichtigen, daß die Körper, welche die Carotinoide enthalten, wie die Plastide und der Augenfleck bei Euglena, durch das Molisch'sche Reagens destruiert werden und daß die Carotinoide sich nicht immer in den Zellen ausscheiden, in welchen sie sich in der lebenden Pflanze befinden, sondern bisweilen wandern. Darum muß man in diesem Falle die Reagenzien, welche Färbungen hervorrufen, wie Schwefelsäure, Antimonchlorürlösung usw. direkt einwirken lassen. Die Plastide und der Augenfleck bei Euglena werden dann lebhaft blau gefärbt.

Die Säurenmethode, mit welcher man Ausscheidung der Carotinoide in Kristallform durch verdünnte Säuren beabsichtigt, steht der Kalimethode bei weitem nach. Mit der von Tammes empfohlenen Fluorwasserstoffsäure erhielt ich keine besseren Resultate als mit anderen Säuren. Besonders die gelben und orangegelben Carotinoide kristalli-

sieren nicht aus. Die Einwirkung der Säuren ist oft mit einer Zersetzung verbunden. Auch Molisch[1]) urteilt ungünstig über die Säurenmethode.

Mehr Aufmerksamkeit verdienen die Resorzinmethode von Tswett mit konzentrierter wässeriger Resorzinlösung und meine Phenolmethode mit konzentrierten Phenollösungen. Letztere kann man nur brauchen für die Ausscheidung von Carotinoiden, welche mit dem Carotin Ähnlichkeit haben, weil Xanthophyll und verwandte Carotinoide in Phenol sehr löslich sind und deshalb nicht auskristallisieren können. In einigen Fällen wandte ich mit Erfolg Erwärmung in einer 10%igen Lösung von Kaliumhydroxyd in Glyzerin an. Vielleicht kann man auch Pyridin und noch andere Stoffe für die Ausscheidung der Carotinoide in Kristallform benutzen. Die letztgenannten Methoden sind nur in wenigen Fällen geprüft worden und deshalb kann man noch nicht genau über ihren Wert urteilen.

Was die verschiedenen Carotinoideraktionen betrifft, bemerke ich zunächst, daß die Behauptung von Tammes, daß die Schwefelsäurereaktion durch sehr geringe Quantitäten Wasser verhindert wird, nicht richtig ist. Die besten Resultate erhält man gerade mit Schwefelsäure, welche ein wenig Wasser hinzugefügt ist. Empfehlenswert ist es bei der Untersuchung Schwefelsäure verschiedener Stärke zu benutzen, z. B. von 66½, 76, 85½ und 95%. Mit Schwefelsäure genügender Stärke färben sich alle untersuchten Carotinoidkristalle blau. Durch Salpetersäure und Bromwasser werden sie vorübergehend blau gefärbt. Mit Jodjodkaliumlösung nehmen sie in den meisten Fällen sofort oder nach einiger Zeit eine grünliche Farbe an. In einigen Fällen aber behalten sie in Jodjodkaliumlösung ihre ursprüngliche Farbe bei.

Neue Carotinoidreagenzien sind gesättigte Lösungen von Antimonchlorür und Zinkchlorid in 25%iger Salzsäure und eine gesättigte Lösung von kristallwasserfreiem Aluminiumchlorid in 38%iger Salzsäure. Mit der Antimonchlorürlösung erhält man stets bei der gewöhnlichen Temperatur eine dunkelblaue Farbe; mit der Zinkchloridlösung ist das meistens auch der Fall. Wenn die Blaufärbung nicht eintritt, muß man, um sie hervorzurufen, die Präparate auf dem Objektträger schwach erwärmen. Mit der Aluminiumchloridlösung kann man auch eine schöne Blaufärbung bekommen, wenn man durch schwache Erwärmung auf dem Objektträger die Einwirkung befördert.

Zu Lösungsmitteln, nämlich zu Alkohol, Azeton, Chloralhydratlösung (70%ige), alkoholischer Seifenlösung und konzentrierten Phenol-

---

1) Mikrochemie der Pflanze, pag. 227.

lösungen verhalten die Carotinoide sich verschieden. Verflüssigtes Phenol (10 Gewichtsteile Phenol und ein Gewichtsteil Wasser) und Phenol in Glyzerin (drei Gewichtsteile Phenol und ein Gewichtsteil Glyzerin) eignen sich besonders um die Carotinoide zu trennen und voneinander zu unterscheiden. Auch eine wässerige gesättigte Phenollösung (ungefähr 8%ige) kann man benutzen. Einige Kristalle zerfließen sofort, andere überhaupt nicht.

Die Carotinoidkristalle, welche man nach der Methode von Molisch oder auf andere künstliche Weise erhält, und auch die, welche in der lebenden Pflanze vorkommen, unterscheiden sich in der Farbe und in dem Verhalten zu Reagenzien und Lösungsmitteln. Das Verhalten der Carotinoide zu Schwefelsäure verschiedener Stärke, Chlorzinklösung, Jodjodkaliumlösung, Bromwasser, Salpetersäure und besonders zu Phenollösungen ist verschieden. Auf Grund dieser Resultate nehme ich an, daß im Pflanzenreich verschiedene Carotinoide vorkommen. Ihre Anzahl kann man vorläufig noch nicht schätzen.

Bisweilen scheint es, daß dasselbe Carotinoid in verschiedenen Objekten anwesend ist, wie beispielsweise das Lycopin, aber es ist schwer, dieses auf mikrochemischem Wege festzustellen. Durch sorgfältige makrochemische Untersuchungen muß in solchen Fällen der Beweis der Identität geliefert werden. Doch kann die mikroskopische und mikrochemische Untersuchung zur Vermehrung unserer Kenntnis der Carotinoide beitragen, wenn sie auf sorgfältige Weise stattfindet. Wenn die Quantität des Materials für eine makrochemische Untersuchung nicht genügt, ist eine mikrochemische Untersuchung noch ausführbar. Weil diese verhältnismäßig wenig Zeit beansprucht, ist es möglich, eine große Anzahl Objekte zu untersuchen und eine Übersicht über das Vorkommen der Carotinoide im Pflanzenreich zu erhalten. Weiter führt die mikrochemische Untersuchung zu Resultaten, welche die Lokalisation der Carotinoide und die Natur der Plastiden betreffen.

Was das Vorkommen der Carotinoide im Pflanzenreich betrifft, bemerke ich, daß in vielen Fällen nicht ein Carotinoid anwesend ist, sondern zwei und bisweilen noch mehr. In den untersuchten chlorophyllhaltigen Objekten, in 17 Blättern, 1 Blumenkelch und 16 Algen fand ich immer zwei Carotinoide, ein rotes oder orangerotes und ein gelbes oder orangegelbes. Bei Haematococcus pluvialis fand ich außerdem noch ein drittes Carotinoid. Von den 40 Blüten, welche ich untersuchte, konnte ich bei den folgenden 14 zwei Carotinoide nachweisen: Asclepias curassavica, Calceolaria rugosa, Cucurbita melanosperma, Erysimum Perofskianum, Eranthis hyemalis, Ferula sp., Hemerocallis Midden-

dorffii, Isatis tinctoria, Narcissus Pseudonarcissus, Narcissus poeticus, Nuphar luteum, Thermopsis lanceolata, Trollius caucasicus und Tulipa hortensis und bei einer, Dendrobium thyrsiflorum, drei Carotinoide. Von den 11 untersuchten Früchten fand ich bei vier zwei Carotinoide, nämlich bei Aglaonema commutatum, Rosa rugosa, Solanum Dulcamara und Solanum Lycopersicum und bei vier drei Carotinoide, bei Capsicum annuum, Sorbus Aria, Sorbus aucuparia und Tamus communis. In dem Arillus von Evonymus latifolius fand ich zwei und in der Wurzel von Daucus Carota[1]) ein Carotinoid. Bei 10 der 34 Fungi, welche ich untersuchte, konnte ich Carotinoid nachweisen. Bei einem, Dacryomyces stillatus, war mehr als ein Carotinoid nachweisbar.

In Verbindung mit der obigen Angabe bemerke ich, daß es möglich ist, daß bei einer wiederholten mikrochemischen Untersuchung mit verfeinerten Methoden es sich zeigen wird, daß noch mehr Carotinoide anwesend sind, als es bis jetzt mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte.

Auch muß man berücksichtigen, daß andere Methoden vielleicht zur Entdeckung mehrerer Carotinoide führen könnten als es bei mikrochemischer Untersuchung möglich ist. In Zusammenhang hiermit weise ich auf die Resultate hin, welche Tswett[2]) auf dem Wege der chromatographischen Adsorptionsanalyse erhielt. Tswett konnte nämlich vier Xanthophylle unterscheiden und er hält auf Grund dieser Beobachtung das Xanthophyll von Willstätter und Mieg für ein isomorphes Gemisch von zwei oder drei Xanthophyllen. Willstätter und Stoll[3]) bemerken dazu, daß die Möglichkeit, daß die Kristalle des Xanthophylls des Chloroplasten aus sehr ähnlichen isomorphen und isomeren Körpern bestehen, für deren Trennung man noch keine präparativen Methoden hat, nicht ausgeschlossen ist.

Von mehreren Pflanzen untersuchte ich sowohl die Blüten wie die Blätter, um zu wissen, ob bei einer Pflanze die Carotinoide in beiden Ob-

---

1) Euler und Nordenson fanden bei einer makrochemischen Untersuchung in der Wurzel von Daucus Carota neben dem Carotin auch etwas Xanthophyll, was vielleicht mit der Tatsache zusammenhängt, daß der obere Teil der Wurzel gewöhnlich etwas chlorophyllhaltig ist (Hans Euler und Ebba Nordenson, Zur Kenntnis des Möhrencarotens und seiner Begleitsubstanzen. Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie 1908, Bd. LVI, pag. 227.)

2) M. Tswett, Physik.-chem. Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen, l. c. pag. 320. Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode usw., l. c. pag. 388. L'état actuel de nos connaissances sur la chimie de la chlorophylle, 1912, pag. 24. Les Chromophylles dans les Mondes Végétal et Animal, 1910 (Russisch).

3) R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll usw. 1913, pag. 234.

jekten eine gewisse Übereinstimmung zeigten. Dies war aber nicht der Fall. Vielmehr stimmen die Carotinoide der Blätter verschiedener Pflanzen miteinander überein, insofern ein rötliches und ein gelbliches Carotinoid immer nebeneinander in den Blättern vorkommt.

Bei meinen mikroskopischen und mikrochemischen Untersuchungen bin ich zu ganz anderen Resultaten gelangt als Tammes und Kohl. Ihr Schluß, daß im Pflanzenreich nur ein Carotinoid (Carotin) vorkommt, ist auch das Resultat mikroskopischer und mikrochemischer Untersuchungen, aber derselbe stützt sich nicht auf zutreffende Gründe. Tswett[1]) und Willstätter[2]) haben auch schon darauf hingewiesen. Die letzten Resultate der makrochemischen Untersuchung haben den Beweis geliefert, daß im Pflanzenreich verschiedene Carotinoide vorkommen. Willstätter und seine Schüler isolierten nämlich aus vier Objekten vier verschiedene Carotinoide. Meine mikrochemischen Untersuchungen haben deshalb zu Resultaten geführt, welche mit denen der makrochemischen Untersuchung in Übereinstimmung stehen.

---

1) l. c.
2) Richard Willstätter und Walter Mieg, l. c.

Groningen, März 1914.