

Untersuchungen an Buchweizensamenschalen.

Von

Kurt Fessler, Heiligenstadt.

(Aus dem physiologischen Institut der Kgl. Tierärztl. Hochschule zu Hannover.

Direktor: Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Tereg.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. April 1913.)

Im Nordwesten Deutschlands wird Buchweizen auf kargem Boden häufig als genügsame Kulturpflanze angebaut. Seine braunen Früchte werden in besonderen Buchweizenmühlen von den harten Schalen befreit und zu Mehl verarbeitet. Kleie, Körner und grüner Buchweizen dienen als Viehfutter, auch die Schalen werden, obwohl sie keinen Futterwert besitzen, unter das Futter gemengt. Schon seit Jahren beobachtete man an Haustieren, denen diese Nahrung geboten wurde, eigenartige Krankheitserscheinungen, die besonders an Tieren mit nichtpigmentierter Haut auftraten, wenn sie dem Sonnenlicht ausgesetzt waren. Im Jahre 1909 wurde von Joh. Fischer⁽¹⁾ als photodynamische Ursache hierfür ein grüner Farbstoff gefunden, der namentlich in den braunen Samenschalen reichlich vorhanden ist und nicht mit Chlorophyll identisch sein sollte. Diese Feststellung gab die Veranlassung zu weiteren Untersuchungen an Buchweizensamenschalen, über die ich hier Bericht erstatten möchte.

Die Buchweizensamen sind Schließfrüchte, deren Schale aus drei harten in scharfen Kanten aneinander stoßenden Teilen besteht. Die mikroskopische Betrachtung eines solchen Teiles zeigt einen Aufbau aus drei Zellschichten, eine vierte Zellschicht, die innere Epidermis, ist nur in Resten vorhanden bei den aus den Mühlen stammenden Schalen. Die äußere Epidermis besteht aus tafelförmigen Zellen, die hin und wieder braun gefärbt sind. Darunter befindet sich eine mehrschichtige

prosenchymatische stark verholzte Sklerenchymschicht, die der Schale ihre Festigkeit verleiht. Die dritte Schicht ist eine lockere mehrreihige von dünnwandigen unregelmäßigen Parenchymzellen, die tief braun gefärbt sind von eingelagertem Phlobaphen. Wird dieser dunkelbraune Farbstoff teilweise entfernt, so werden im mikroskopischen Bild zahlreiche Chloroplasten sichtbar, die meist zu mehreren zusammengeballt sind. Ihr intaktes Vorhandensein erklärt sich leicht, wenn man bedenkt, daß der Buchweizen ziemlich früh, also vor völligem Ausreifen abgeerntet wird und dann eine Desorganisation der Chromatophoren nicht mehr stattfinden kann.

Die Herstellung der grünen Farbstoffextrakte, die den weiteren Untersuchungen dienen, geschah in vor direktem Licht geschützten Gefäßen bei Zimmertemperatur. Quantitäten von 200 g bis 3 kg wurden mit dem Lösungsmittel, Äther, 96^o/₁₀igem Alkohol, Aceton, Chloroform, Benzin oder Schwefelkohlenstoff behandelt und die erhaltene Lösung nochmals zum Extrahieren einer neuen Menge Schalen benutzt. Die so erhaltenen ätherischen und Chloroformlösungen zeigen grüne Farbe und rote Fluoreszenz, die alkoholischen und Acetonextrakte sind dunkelgrün und besitzen braunrote Fluoreszenz. Benzin nimmt nur schwache Färbung an und die Farbe des Schwefelkohlenstoffauszugs ist oliv nach hellbraun hin, Fluoreszenz fehlt.

Nach längerem Stehen verändert sich die grüne Farbe der Extrakte in gelbgrün bzw. braungrün. Ebenso schlägt beim Einengen die Farbe in einen bräunlichen Ton um unter Schwinden der Fluoreszenz. Beim Eindampfen zur Trockene oder Verdunsten hinterbleibt vom alkoholischen Auszug eine braune lackartige Masse, die sich fettig anfühlt und die Finger grün färbt. Beim Wiederauflösen des Rückstandes mit Alkohol resultiert eine bräunlichgrüne Lösung, mit Äther erhält man eine grüne Lösung und einen braunen Rückstand, der in Aceton mit brauner Farbe in Lösung geht.

In allen Lösungen, besonders in eingeengten, bildet sich nach längerem Stehen ein geringer graugrüner Bodensatz. Durch Zentrifugieren oder sorgfältiges Filtrieren ist er zu isolieren;

mit Äther gewaschen wird er rein weiß und gibt mit Chloroform und Schwefelsäure die blutrote Phytosterinreaktion.

Die spektroskopische Untersuchung der rohen Extrakte ergibt das Chlorophyllspektrum, wobei jedoch Band IV stets sehr kräftig hervortritt. Die beobachteten Wellenlängen einer ätherischen Lösung in 5 mm Schichtdicke (Zeißches Vergleichsspektroskop nach Quincke) in $\lambda \mu\mu$ seien hier angegeben:

Band I	670—630
II	620—600
III	585—560
IV	545—525
V	460—450
VI	440—426. Endabsorption 415.

Die Dunkelheit der Bänder ist I > II > IV > III.

Für die Wellenlängen einer alkoholischen Lösung in 40 mm Schichtdicke ergeben sich die Werte:

Band I	680—635
II	620—600
III	580—570
IV	542—530
V	485—460
VI	440—430

} in verdünnter Lösung sichtbar werdend.

Endabsorption 505 bzw. 425. Die Intensität der Bänder ist nach ihrer Dunkelheit I > II > IV > III im weniger gebrochenen Spektralteil.

Der sehr schwach gefärbte Benzinauszug zeigt außer diesen sechs durch die Dispersion des Lösungsmittels nach Ultrarot verschobenen Bändern noch ein Band VII λ 440—430 $\mu\mu$.

In krystallisiertem Zustande konnte aus den Extrakten Chlorophyll nicht abgeschieden werden.

Die Untersuchung auf die beiden grünen Komponenten des Chlorophylls geschah nach der Methode von Marchlewski.⁽²⁾ Nach Durchschütteln eines alkoholischen Chlorophyllextraktes mit gleicher Menge Schwefelkohlenstoff zeigte bereits die erste Schwefelkohlenstofffraktion den Absorptionsstreifen des Allochlorophylls neben dem ersten Chlorophyllband. In verdünnter Lösung erschien bei 10 mm Schichtdicke deutlich eine dunklere Absorption von λ 685—655 $\mu\mu$ und daneben eine hellere bis λ 640 $\mu\mu$. In stärkerer Konzentration trat eine starke Verdunkelung des nach Infrarot liegenden Teiles

685—660 des ersten Bandes ein, während von 660—640 die Stärke des Bandes nicht zunahm. Marchlewski erklärte das Sichtbarwerden des Allochlorophyllstreifens in Schwefelkohlenstoff in der Weise, daß dieser fast die gleiche Lage wie in alkoholischer Lösung behält, daß dagegen das erste Chlorophyllband des CS_2 -Extraktes mehr nach Infrarot verschoben wird als in alkoholischer Lösung und so der Eindruck zweier nebeneinanderliegender Bänder entsteht.

Eine Isolierung von reinem Chlorophyll unter Beseitigung des Allochlorophylls nach der Methode von C. A. Schunck und Marchlewski⁽²⁾ gelang nicht, weil das Chlorophyll bei jedem angestellten Versuch eine Umwandlung erlitt.

Alkalisches Chlorophyll wurde durch Verseifen mit alkoholischer Natronlauge aus dem rohen alkoholischen Extrakt erhalten. Das Filtrat des zur Trockene gedampften und ausgeätherten in Wasser gelösten Gemenges lieferte nach Zusammen gießen mit der 10fachen Menge gesättigter Kochsalzlösung einen flockigen Niederschlag. Dieser wurde ausgewaschen, mit Alkohol aufgenommen, dann in wässrige Lösung übergeführt und nach Vermischen mit Essigsäure mit Äther extrahiert. Die erhaltene ätherische nicht fluorescierende Lösung zeigte folgendes Spektrum:

Band I	680—630
II	605—595
III	Schatten bei 580
IV	550—538
V	505—490

Endabsorption 440. Intensität: $I > IV > II = V > III$.

Bei Einwirkung von Salzsäure auf die Rohchlorophylllösungen reagierte weder alkoholischer noch ätherischer Extrakt in der Weise, daß die ätherische Schicht gelb und die saure blaugrün wurden, sondern bei Ätherextrakt färbte sich die saure Zone schwachgrün und der Äther braungrün. Auf Zufügen von Salzsäure im Überschuß entstand ein Niederschlag, der sich in Äther wieder löste.

Fügte man nach der Frémyschen Weise zu alkoholischem Extrakt Äther und Salzsäure, so resultierte eine gelbgrüne obere und eine hellbraune untere Schicht, letztere ging später

in Rot über, was auf Anwesenheit mitausgezogener zuckerartiger Stoffe zurückzuführen war.

Die Einwirkung von Salzsäure oder von Oxalsäure führte sofort einen Farbumschlag in gelbgrün bzw. braun unter Schwinden der Fluorescenz herbei. Ein Niederschlag entstand in der salzsäuren Lösung erst auf Zugabe von Wasser und in der Oxalsäure enthaltenden erst nach Zur-Trockene-dampfen in der Lösung des Rückstandes. Die in Chloroform gelösten Niederschläge besaßen ein Spektrum von 5 Bändern entsprechend dem Chlorophyllan- bzw. Phaeophytin-Spektrum.

Von gelben Farbstoffen konnte in den Rohlösungen nur ein Xanthophyll nachgewiesen werden, das in Benzin schwer, in Alkohol leicht löslich ist. Die Isolierung des gelben Farbstoffes geschah nach den Verseifungsmethoden von Hansen⁽³⁾ und Kohl.⁽⁴⁾ Nach mehrstündigem Kochen des alkoholischen Rohextraktes mit alkoholischer Natron- bzw. Kalilauge und nach teilweisem Einengen wurde das überschüssige Alkali in Carbonat übergeführt und das zur Trockene gedampfte Gemenge mit Äther gründlich extrahiert. Die gelbe Ätherlösung hinterließ beim Eindampfen, wobei sich ein starker Geruch bemerkbar machte, orangegelbe, ölige Tropfen, die mit Äther und Benzin aufgenommen beim Verdunsten farblose, strahlenartig zusammengestellte Nadeln lieferten. In Alkohol umkrystallisiert, nahmen die Nadeln die Gestalt dünner Blättchen an. Auf Zufügen von Chloroform und Schwefelsäure gaben die Krystalle die rote Phytosterinreaktion.

Engt man die gelben ätherischen Lösungen im Kohlen säurestrom stark ein, fügt gleiches Volumen absoluten Alkohols zu und läßt, nachdem nochmals ein Teil des Äthers auf dem Wasserbad verdampft ist, die Lösung im Dunkeln stehen, so krystallisieren während des Verdunstens kleine, goldgelbe, trapezförmige Tafeln einzeln und in Drusen aus, die unter dem Mikroskop schwach gelb gefärbt erscheinen. Sie lösten sich nicht in Benzin, wohl aber in Alkohol und in Chloroform. Letztere Lösung nahm bei Zugabe eines Tropfens Schwefelsäure blaue Farbe an, Schwefelsäure allein löste die Krystalle mit dunkelbrauner Farbe.

Die spektroskopischen Eigenschaften des gelben Farbstoffs charakterisieren sich durch zwei Bänder hinter der F-Linie und Endabsorption.

Ihre Lage ist in	Endabs.:		
ätherischer Lösung	λ 490—470 $\mu\mu$	λ 452—438 $\mu\mu$	λ 430 $\mu\mu$
alkoholischer Lösung	» 490—470 »	» 455—440 »	» 420 »
Schwefelkohlenstofflösung (rot) »	» 512—490 »	» 480—465 »	» 410 »

Dieses Xanthophyll wird von Tierkohle ebenso resorbiert wie Chlorophyll, jedoch beim Auskochen der Tierkohle mit alkoholischer Natronlauge an diese abgegeben.

Mit Salzsäure geht der in Alkohol gelöste Farbstoff keine Farbreaktion ein.

Die gelbe Farbe des Stoffes ist nicht lichtbeständig.

Der Farbstoff zeigt ein inniges Verhalten zu Phytosterin. Auch die Form der farblosen wie der gelben Krystalle ist die für die Phytosterinkrystalle bekannte Gestalt. Die ölige Konsistenz des gelben Rückstandes läßt vermuten, daß der gelbe Farbstoff nicht eigene Krystalle liefert, sondern, wie es Reinke früher bei Carotin annahm, mechanisch dem Phytosterin beigemischt ist. Der blaue Ausfall der Reaktion mit Chloroform und Schwefelsäure dürfte nur solange eintreten, als der gelbe Farbstoff anwesend ist; wird er wie unter dem Einfluß des Lichtes zersetzt, so tritt die rote Phytosterinreaktion ein.

Auch der braune, die Farbe der Schalen bedingende Farbstoff wurde untersucht. Er ist ein den Schalen fest anhaftender Stoff, der in den Parenchymzellen, hin und wieder auch in den Epidermis- und in Sklerenchymzellen seinen Sitz hat. Teilweise extrahieren läßt er sich mit heißem und kaltem Wasser, mit Aceton und mit Alkohol.

Die Lösungen reduzieren Fehlingsche Lösung und auf Zusatz von Ammoniak Silbersalzlösung. Bromwasser fällt aus wässriger Lösung voluminösen Niederschlag. Mit Ferrichlorid wird ein dunkelgrüner, zuerst schwebender Niederschlag erhalten, der sich beim Kochen in feinen schwarzen Teilchen abscheidet. Mit Natronlauge erhitzt, schlägt die hellbraune Farbe der Lösung in dunkelrotbraun um.

Diese Eigenschaften charakterisieren das Pigment als ein

Phlobaphen. Die Versuche, reine Gerbstoffe zu erhalten aus alkoholischer Lösung mittels Destillation und nachfolgender Extraktion mit Essigäther, schlugen fehl. Ebenso wenig gelang dies aus wässrigen Lösungen, die mit Bleiacetat gefällt und deren Niederschlag mit Schwefelsäure oder Schwefelwasserstoff zersetzt und mit Essigäther extrahiert wurde.

Ein festes, dunkelbraunes Produkt erhält man aus wässrigen Extrakten, wenn man mehrmals mit Alkohol fällt. Es hinterbleibt ein goldgelbes Filtrat, das zu einer fettigen Masse von zusammenziehendem Geschmack und an Honig erinnerndem Geruch eindunstet. Der dunkelbraune Niederschlag ist von zäher, klebriger Art und trocken ein klumpenbildendes Pulver, löslich in Wasser, unlöslich in Alkalien, Äther und Alkohol.

Salzsäure wird beim Erhitzen mit dem Pulver gerötet, ohne es zu lösen, in gleicher Weise wird Salpetersäure gelb, dagegen löst Schwefelsäure zu brauner Flüssigkeit.

Die wässrige Lösung des Niederschlags reduziert Fehlingsche Lösung und gibt mit Eisenchlorid grüne Fällung.

Die bei der trockenen Destillation des braunen Pulvers entstehenden Dämpfe röten einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan. Die Kalischmelze lieferte Spuren von Phloroglucin, die durch eine geringe Rotfärbung auf Zusatz von Vanillin und Salzsäure zur ätherischen Lösung sich bemerkbar machten. Auf Grund dieser Eigenschaften dürfte das Phlobaphen in die Pyrocatecholgerbstoffgruppe einzureihen sein.

Von weiterreichendem Interesse dürfte die durch diese und die Untersuchungen Fischers erbrachte Feststellung sein, daß die Buchweizenkrankheit unserer Haustiere auf die photodynamische Wirkung des Buchweizenchlorophylls zurückzuführen ist.

Literatur.

1. Joh. Fischer, Untersuchungen über einige Bestandteile des Buchweizens in Rücksicht auf die Ätiologie der Buchweizenkrankheit. Dissertation Bern. Köln-Ehrenfeld 1909.
2. L. Marchlewski. Die Chemie der Chlorophylle und ihre Beziehung zur Chemie des Blutfarbstoffs. Braunschweig 1909.

Ferner: R. Willstätter, Chlorophyll und seine wichtigsten Abbauprodukte in Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, Bd. 2. Herausgegeben von E. Abderhalden, Berlin-Wien 1910.

3. A. Hansen, Die Farbstoffe des Chlorophylls, Darmstadt 1889.

4. F. G. Kohl, Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Bedeutung in der Pflanze. Leipzig 1902.

Ferner: Roscoe-Schorlemmer-Brühl, Lehrbuch der organischen Chemie, VI. Teil. Braunschweig 1901.

C. A. Schunck, The Yellow Colouring Matters accompanying Chlorophyll and their Spectroscopic Relations. Proceed. Royal Society, Vol. 65, 1899. London 1900.

R. Willstätter, Chlorophyll in Biochem. Handlexikon, herausg. von E. Abderhalden, Bd. 6, Berlin 1911.

M. Nierenstein, Darstellung und Nachweis der Gerbstoffe in Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, Bd. 2, herausg. von E. Abderhalden, Berlin-Wien 1910.
