Die Wanderung der Alkaloide aus dem Pfropfreise in die Unterlage.

Von Ernst Schmidt und Arthur Meyer.

(Eingegangen den 18. VI. 1907.)

Die Fragen, ob die Alkaloide in der Pflanze wandern und welche Wege sie bei dieser Wanderung einschlagen, sind noch nicht gelöst. Sie wurden bei den unter unserer Leitung von Feldhaus (1903) und von Kircher (1905) ausgeführten Arbeiten in folgender Weise berührt:

Es läßt sich schon mikrochemisch erkennen, daß in den Blättern von *Datura Stramonium*, ebenso in denen von *Hyoscyamus* (Siim Jensen, 1901), die Alkaloide im Parenchym der Leitbündel viel reichlicher vorkommen als im Assimilationsparenchym. So fand auch Feldhaus in den Mittelnerven und Sekundärnerven von *Datura* 1,39 %, im Mesophyll mit den kleineren Nerven nur 0,48 % Alkaloid, bezogen auf Trockensubstanz, im Blattstiele etwas weniger Alkaloid als im Mittelnerven. Im allgemeinen verhielt sich der Alkaloidgehalt von Blattspreite mit Nerven höherer Ordnung: Mittel- + Sekundärnerven: Blattstiel = 1:3:1,5.

Feldhaus (19. B. S. 82) schnitt nun von einer größeren Anzahl von Laubblättern die Spreitenhälften rechts und links vom Mittelnerven ab und ließ die Blattstiele mit den daran sitzenden Mittelnerven der Blätter vom 30. Juli bis 28. August an den Pflanzen. Danach fand er in Mittelrippe und Blattstiel zusammen nur 0,29 % Alkaloid, also viel weniger als in der normalen Blattspreite.

Kircher verfolgte diese Erscheinung weiter, indem er folgendermaßen verfuhr: Zuerst sammelte er von zwei verschiedenen Beeten (I und III) von *Datura Stramonium* je ungefähr 300 ganze Blätter. Zweitens schnitt er von ungefähr 700 Blättern des Beetes I die Spreiten rechts und links vom Mittelnerven völlig ab und sammelte sogleich 300 Blattstiele + Mittelnerven; die übrigen Blattstiele + Mittelnerven ließ er an den Pflanzen sitzen und sammelte sie erst nach fünf und nach acht Tagen, nach welcher Zeit manche Blattstiele abgefallen, manche erkrankt waren. Drittens schnitt er von einer gleichen Anzahl von Blättern des anderen Beetes (No. III) die Spreitenteile bis auf einen Streifen von 2—3 mm, welchen er an jeder Seite des Mittelnerven stehen ließ, ab und verfuhr damit wie vorher gesagt; es hielten sich diese Blattstiele + Mittelnerven gut und fielen nicht ab. Als er die Trockensubstanz aller Proben untersuchte, fand er folgendes:

Ganze Blätter	{	I = 0,33 % Alkaloid.	
	{	III = 0,35 "	"
Direkt gesammelte Stiele + Mittelnerven	{	I = 0,8 "	" Spreite völlig entfernt.
	{	III = 0,81 "	" 2-3 mm Spreite am Mittelnerven.
Nach fünf Tagen gesammelt	{	I = 0,65 "	"
	{	III = 0,79 "	"
Nach acht Tagen gesammelt	{	I = 0,5 "	"
	{	III = 0,78 "	"

Es ist damit bewiesen, daß der Alkaloidgehalt an der Pflanze sitzender Blattstiele + Mittelnerven, denen die Spreiten genommen wurden, mit der Zeit mehr und mehr abnimmt, daß aber schon ein geringer Teil der ansitzenden Spreite diese Abnahme stark herabsetzt. Wenn dieses Resultat auch nicht beweist, daß das Hyoscyamin aus dem Stiele aus- und in die Achse einwandert, so liegt doch die Annahme nahe, daß die Abnahme des Alkaloides im Stiele auf einer Auswanderung des Alkaloides beruht.

Demgegenüber schien die Frage, ob die Alkaloide von dem Orte ihrer Entstehung wegwandern können, durch einen von Strasburger (1885 und 1906) angestellten Versuch gelöst zu sein. Durch Strasburger veranlaßt, untersuchte Klinger 800 g Kartoffelknollen, welche an einer durch ein Pfropfreis von *Datura Stramonium* ernährten Unterlage von *Solanum tuberosum* entstanden waren, und fand darin Atropin. Strasburger (1885, S. XXXIX) sagt: „Er (Klinger) fand — Atropin, wenn auch nur in äußerst geringen Mengen; nach seiner Schätzung würden die 800 g Knollen kaum einige Milligramm Atropin enthalten haben.“ Klinger unterwarf übrigens auch 600 g gewöhnlicher Kartoffelknollen der Untersuchung und fand darin weder Atropin noch ein dem Atropin ähnliches Alkaloid.

Es schien uns nun für die Frage der Alkaloidwanderung zuerst eine Kontrolle der vorliegenden Angaben von Interesse zu sein. Da eine Pfropfung von *Datura Stramonium* im Frühjahr 1906 gut angewachsen war, beschlossen wir die zu erwartenden Kartoffeln dazu zu benutzen und im kommenden Frühjahr die am Schlusse dieser Notiz aufgeführten Fragen zu beantworten. Während der Zeit sind nun weiter zwei hierher gehörende Arbeiten erschienen, zuerst die von Grafe und Linsbauer (1906).

Grafe und Linsbauer experimentierten mit *Nicotiana affinis* und *Nicotiana Tabacum*, die sie wechselweise aufeinander pflropften. Sie betrachten *N. affinis* als nikotinfrei oder als so nikotinarm, daß sie ihren Nikotingehalt nicht in Betracht ziehen; da aber *N. affinis*

Nikotin enthält und anzunehmen ist, daß ihr Nikotingehalt ähnlichen Schwankungen unterliegt wie der von *N. Tabacum*, deren Alkaloidgehalt zwischen 0,7 % und 5 % schwankt, so ist dieses Vorgehen wohl etwas unkritisch und läßt leider Zweifel an der Zuverlässigkeit der Resultate entstehen. Es hätte zuvor eine größere Anzahl von Individuen der benutzten *N. affinis* genau auf ihren Alkaloidgehalt untersucht werden müssen.

Die Versuche der Autoren zeigten nun, daß *N. affinis* stets Nikotin enthielt (0,84 bis 3,56 %), wenn sie als Pfropfreis einer Pflanze von *N. Tabacum* mit ungefähr 4 % Nikotingehalt aufsaß, oder wenn sie als Unterlage für *N. Tabacum* diente. Die Autoren machen auch einen Versuch, welcher die Frage entscheiden soll, ob die Fähigkeit von *N. affinis*, Nikotin zu bilden, gesteigert werde, wenn sie mit *N. Tabacum* verbunden werde. Sie pflanzten *N. Tabacum* auf *N. affinis*. Am 9. April schnitten sie das Reis unterhalb der Pfropfstelle ab und ließen die Unterlage Zweige bilden, deren Alkaloidgehalt am 15. Mai 0,33 % betrug. Danach vermuten die Autoren, „daß die Befähigung der Unterlage zur Nikotinbildung durch die Wirkung des nikotinreichen Edelreises gesteigert wird“. Unserer Meinung nach liegt kein Grund zu dieser Vermutung vor. Man könnte, wenn man sich auf die Angaben der Autoren stützt, sehr wohl annehmen, daß die 0,3 % Alkaloid eingewandert seien, da ja die Unterlage vor dem Abschneiden des Pfropfreises von letzterem 2,9 % Alkaloid zugeführt erhalten haben könnte. Freilich dürfte man auch annehmen, daß *N. affinis* die 0,3 % Alkaloid selbst gebildet habe.

Wären die Resultate der Versuche von Grafe und Linsbauer einwandfrei, so würden sie beweisen, daß bei zwei nahe verwandten, nikotinbildenden Pflanzen das Nikotin äußerst leicht durch die Pfropfstelle hindurchwandern kann.

In der anderen der erwähnten Arbeiten teilte ferner H. Lindemuth (1906) mit, daß er 1896 835 g Kartoffelknollen, welche durch ein Pfropfreis von *Datura Stramonium* ernährt worden waren, von Lewin habe untersuchen lassen, welcher folgendes mitgeteilt habe: „Es würde ihm von großem Interesse sein, zu wissen, auf welchem Wege Herr Dr. Klinger das Atropin isoliert hat. Atropin chemisch nachzuweisen sei absolut unmöglich. Auf einem sehr umständlichen Wege ließ sich dartun, daß in den Kartoffeln, nach Abtrennung reichlichen Solanins, eine nicht isolierbare Substanz in winzigen Spuren zurückblieb, die das durch Muskarin zum Stillstand gebrachte Froschherz wieder in Bewegung setzte.“

Es leuchtet ein, daß das Erscheinen dieser beiden besprochenen Abhandlungen kein Grund für uns sein konnte, unseren vorher er-

wählten Plan aufzugeben, und wir haben danach zuerst die Untersuchung der Kartoffelknollen in folgender Weise ausgeführt:

Im Herbst 1906 stand uns also die sehr kräftige Pflanzung von *Solanum tuberosum* zur Verfügung. Es waren im Mai 1906 auf drei Zweige einer ausgetriebenen Kartoffelknolle drei Pfropfreiser von *Datura* aufgesetzt worden, die ungefähr 80 cm hoch geworden waren und ungefähr 800 g bis 7 cm lange, rundliche Kartoffeln gebildet hatten. Die Blüten der *Datura* wurden stets entfernt, nur eine gut entwickelte, noch nicht völlig reife Kapsel war bei der Kartoffelernte an den Achsen von *Datura* vorhanden.

Von den geernteten Kartoffeln diente ein Teil (410 g) zur Prüfung auf mydriatisch wirkende Alkaloide. Die hierzu verwendeten Knollen, welche sich also in ihrem Aeußeren und in ihren Größen durchaus nicht von den normalen Kartoffeln unterschieden, wurden zu diesem Zwecke in eine breiartige Masse verwandelt, letztere hierauf mit dem dreifachen Volumen Alkohol von 95 % vermischt und das Gemisch alsdann unter zeitweiligem Umschütteln sechs Tage lang bei einer Temperatur von 20—25° stehen gelassen. Nach dieser Zeit ist die schwach sauer reagierende Flüssigkeit abkolliert, der Rückstand ausgepreßt und unter den gleichen Bedingungen von neuem mit Alkohol extrahiert worden. Die vereinigten Alkoholauszüge wurden hierauf filtriert und durch Destillation im luftverdünnten Raume von Alkohol befreit.

Der erkaltete Destillationsrückstand (D) wurde abermals filtriert, alsdann im Scheidetrichter mit dem gleichen Volumen Chloroform-Aether (2 Teile Chloroform, 5 Teile Aether) überschichtet und nach dem Zusatz von gepulvertem Natriumbikarbonat längere Zeit geschüttelt. Dieses Ausschütteln ist dreimal mit je dem gleichen Volumen Chloroform-Aether wiederholt worden. Die vereinigten Chloroform-Aetherauszüge sind hierauf unter zeitweiligem Aetherzusatz eingedampft worden, bis durch empfindliches rotes Lackmuspapier eine Abgabe von Ammoniak nicht mehr zu konstatieren war. Der Rückstand wurde hierauf dreimal mit je 5 ccm Wasser, welches schwach mit Salzsäure angesäuert war, ausgeschüttelt und die vereinigten sauren Flüssigkeiten alsdann mit den allgemeinen Alkaloidreagentien auf Pflanzenbasen geprüft. Diese Prüfung fiel jedoch unter Anwendung von je einem Tropfen des sauren Auszuges negativ aus. Erst als dieselbe über Aetzkalk im Vakuum bis auf etwa 2 ccm eingeeengt war, konnten schwache Alkaloidreaktionen beobachtet werden.

Da nach den Erfahrungen, welche von dem einen von uns bei der Isolierung mydriatisch wirkender Alkaloide aus pflanzlichem Material vielfach gemacht wurden, es nicht ausgeschlossen war, daß

die von dem erkalteten Destillationsrückstande (D) abfiltrierten fett-haltigen Massen etwas Alkaloid enthalten konnten, so wurden dieselben wiederholt mit Petroleumäther extrahiert und diese Auszüge alsdann mit Wasser, dem eine geringe Menge Salzsäure zugefügt war, ausgeschüttelt. Diese Auszüge wurden nach dem Verdunsten über Aetzkalk im Vakuum mit den obigen vereinigt.

Zur Identifizierung der anscheinend nur in sehr geringer Menge vorliegenden Alkaloide wurde die Flüssigkeit mit einem Tropfen Goldchloridlösung versetzt und alsdann der freiwilligen Verdunstung überlassen. Hierbei war die Bildung einzelner gelblicher Aggregate von winziger Größe zu beobachten, von Aggregaten, welche eine gewisse Aehnlichkeit mit denen zeigten, die, allerdings in größerem Formate, bei der Verdunstung einer unreinen, in entsprechender Weise aus pflanzlichem Material dargestellten Lösung von Atropin- und Hyoscyamingoldchlorid auftreten. Ein wiederholt ausgeführter Versuch, diese winzigen Partikelchen nach vorsichtiger Entfernung der kleinen Mengen von Mutterlauge durch Umkrystallisation in die typischen Formen des Atropin bzw. Hyoscyamingoldchlorids überzuführen, mißlang, indem an deren Stelle stets nur wenige amorphe, gelbe Flocken resultierten.

Die Chloroform-Aetherauszüge, welche bei dem weiteren Ausschütteln des Kartoffelextraktes nach Zusatz von Sodalösung noch erhalten wurden, lieferten selbst in konzentrierterer Lösung kaum noch Alkaloidreaktionen. Da bei der weiteren Prüfung dieser Auszüge sich auf chemischem Wege noch weniger ein positiver Anhalt für das Vorhandensein eines mydriatisch wirkenden Alkaloids ergab, als dies bei denen, welche aus dem mit Natriumbikarbonat alkalisierten Kartoffel-extrakte resultierten, der Fall war, so wurden beide Lösungen vereinigt, um zur physiologischen Prüfung verwendet zu werden. Nach Entfernung des Goldes aus den gesamten jetzt vorliegenden Lösungen und Ausscheidungen durch Schwefelwasserstoff wurden die Flüssigkeiten zu diesem Zwecke im Vakuum über Aetzkalk verdunstet und der winzige Rückstand zur Beseitigung der letzten Salzsäurespuren noch mehrere Tage lang im Vakuumexsikkator über Aetzkalk aufbewahrt. Zur weiteren Reinigung ist der Verdunstungsrückstand schließlich noch mit Alkohol extrahiert in der filtrierten Lösung von neuem im Vakuum verdunstet worden.

Die Herren DDr. A. Lohmann und M. Schenck hatten die Güte, jenes Produkt im hiesigen physiologischen Institut an dem Auge einer Katze auf seine mydriatische Wirkung zu prüfen. Es konnte jedoch innerhalb einer fünfstündigen Beobachtungszeit nicht die geringste Pupillenerweiterung konstatiert werden.

Da nach den Beobachtungen von Donders und Ruyter¹⁾ noch durch einen Tropfen einer Atropinlösung 1 : 130 000 Pupillenerweiterung eintritt und auch Hyoscyamin dieselbe Wirkung, nur etwas langsamer, aber um so nachhaltiger, verursacht (Dragendorff l. c.), so ist wohl kaum anzunehmen, dass in den 410 g der zur Untersuchung benutzten Kartoffeln die Mydriatica in nachweisbarer Menge enthalten waren.

Um weiter einen Anhalt zu gewinnen, wie sich normale Kartoffeln unter den beschriebenen Bedingungen chemisch und physiologisch verhalten, wurde 1 kg davon in der gleichen Weise einer Prüfung unterzogen. Das Verhalten des erzielten Extraktes war durchaus das gleiche wie das der *Datura*-Kartoffelauszüge. Die Chloroform-Aetherausschüttelungen lieferten hier eine Flüssigkeit, welche nach Konzentration auf etwa 2 ccm mit den allgemeinen Alkaloidreagentien Reaktionen gab, die unter Berücksichtigung der größeren Menge des angewendeten Untersuchungsmaterials naturgemäß etwas stärker ausfielen als die früher beobachteten. Bei der Prüfung mit Goldchlorid traten dieselben Erscheinungen auf, wie dieselben oben beschrieben wurden. Auch hier ließen sich die in geringer Menge ausgeschiedenen gelblichen Aggregate nicht durch Umkrystallisation in eine greifbare Form überführen. Die durch Schwefelwasserstoff wieder von Gold befreiten Lösungen wurden daher auch in diesem Falle, nach Entfernung der freien Salzsäure und der sonstigen Beimengungen in der im vorstehenden angegebenen Weise, zur physiologischen Prüfung verwendet. Herr Professor Dr. A. Heffter-Marburg hatte die Güte, letztere auszuführen und als Resultat derselben mitzuteilen, daß sich auch dieses Produkt als ganz wirkungslos auf die Katzenpupille erwiesen hat.

Nach diesen Beobachtungen schien es zunächst nur noch erforderlich zu sein, noch den direkten Beweis zu erbringen, daß die zum Nachweis des Hyoscyamins angewendete Methode auch den Grad von Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit besitzt, welcher für diese Zwecke nötig ist.

Zu letzterem Zwecke wurde 1 kg Kartoffeln in der im vorstehenden dargelegten Weise einer erneuten Prüfung unterzogen, nachdem dem Kartoffelbrei 2 mg Hyoscyamin zugefügt waren. Die hierbei erzielten Auszüge zeigten auch in verdünntem Zustande, d. h. ohne vorherige Konzentration über Aetzkalk im Vakuum, mit den allgemeinen Alkaloidreagentien deutliche Alkaloidreaktionen.

Zur Identifizierung des vorhandenen Alkaloids mit Hyoscyamin, bez. dessen Umlagerungsprodukt, dem Atropin, wurden diese Auszüge in zwei gleiche Teile (A und B) geteilt.

¹⁾ Dragendorff, Ausmittlung von Giften.

Teil A wurde in Vakuum über Aetzkalk verdunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert und diese Lösung hierauf von neuem im Vakuum verdampft. Mit dem Verdunstungsrückstand wurde alsdann die Vitali'sche Reaktion ausgeführt. Dieselbe trat in einwandfreier Weise ein.

Teil B wurde mit einem Tropfen Goldchloridlösung versetzt und alsdann der freiwilligen Verdunstung überlassen. Es gelangten hierbei kleine gelbe Aggregate zur Ausscheidung, die in dem Aeußern durchaus an die erinnerten, welche bei der Verdunstung einer unreinen, in entsprechender Weise aus pflanzlichem Material dargestellten Lösung von Atropin- bzw. Hyoscyamingoldchlorid auftreten. Nach Entfernung der Mutterlauge traten bei vorsichtigem Umkrystallisieren aus schwach salzsäurehaltigem Wasser diese eigenartigen Formen von neuem auf. Zur Ermittlung des Schmelzpunktes war jedoch die Menge dieser Ausscheidungen zu gering.

Zur weiteren Kennzeichnung wurden daher diese Aggregate in Wasser gelöst, diese Lösung im Verein mit der Mutterlauge durch Schwefelwasserstoff von Gold befreit und die filtrierte Flüssigkeit von neuem über Aetzkalk im Vakuum verdunstet. Nach weiterer Reinigung durch Extraktion mit absolutem Alkohol und erneutes Verdunsten resultierte schließlich ein Rückstand, der zur physiologischen Prüfung Verwendung fand.

Die Herren DDr. A. Lohmann und M. Sckenck hatten die Güte, auch dieses Produkt im hiesigen physiologischen Institut an dem Auge einer Katze auf seine mydriatische Wirkung zu prüfen. Nach Verlauf von 20 Minuten konnte hierbei eine deutliche Pupillenerweiterung konstatiert werden.

Erwägt man, daß der mit 2 mg Hyoscyamin versetzte 1 kg betragende Kartoffelbrei nur einmal mit der dreifachen Menge Alkohol extrahiert und abgepreßt war, und berücksichtigt man die bei dieser Operation unvermeidlichen Verluste und teilweisen Zersetzungen des angewendeten Alkaloids, so erhellt, daß nach dem angewendeten Untersuchungsverfahren sich in 500 g Kartoffeln noch weniger als 1 mg Hyoscyamin, sowohl chemisch, als auch physiologisch nachweisen läßt.

Wenn die früher zur Untersuchung verwendeten *Datura*-Kartoffeln daher überhaupt Hyoscyamin enthielten, so durfte nach diesen Erfahrungen die Menge jenes Alkaloids für die zur Prüfung benutzten 410 g weit weniger als 1 mg betragen haben.

Einstweilen ist die Frage, ob Hyoscyamin aus dem Pflropfreis in die Unterlage wandert, im negativen Sinne zu beantworten.

Da jedoch die Angaben von Klinger und auch die von Lewin in gewisser Weise¹⁾ unserer Erfahrung entgegenstehen, so wollen wir unsere Untersuchung, wenn es angeht unter Anwendung einer noch größeren Menge von Kartoffeln, nochmals wiederholen, obschon wir uns überzeugt haben, daß sich mit unserer Methode eine äußerst kleine Hyoscyaminmenge in Kartoffeln nachweisen läßt. Ferner werden wir noch folgende Fragen zu entscheiden versuchen:

1. Da wir wissen, daß aus Blattstielen von *Datura* das Hyoscyamin verschwindet, werden wir fragen, ob vielleicht aus absterbenden Pflöpfreisern von *Datura* Hyoscyamin in die Unterlage wandert.

2. Wir werden ferner zu entscheiden versuchen, ob Hyoscyamin aus entblätterten Pflöpfreisern von *Datura* auswandert.

3. Es soll untersucht werden, ob Nikotin aus Pflöpfreisern von *Nicotiana Tabacum* und *rustica* in die als Unterlage benutzte Kartoffelpflanze einwandert.

4. Wir wollen eventuell Versuche darüber anstellen, ob die Alkaloide der Pflöpfreiser in der Unterlage verändert werden.

5. In allen Versuchen soll die Pflopfstelle mikrochemisch auf die Lagerung der Alkaloide geprüft werden.

Literatur.

Feldhaus, Quantitative Untersuchung der Verteilung des Alkaloides in den Organen von *Datura Stramonium*, Dissertation, Marburg 1903.

Kircher, Ueber das mydriatisch wirkende Alkaloid der *Datura metel*, *Datura quercifolia*, *Datura arborea*, Dissertation, Marburg 1905.

Siim Jensen, Beiträge zur botanischen und pharmakognostischen Kenntnis von *Hyoscyamus niger* L., Bibliotheca botanica Heft 51, 1901; Arbeit aus dem botanischen Institute der Universität Marburg.

H. Lindemuth, Ueber angebliches Vorhandensein von Atropin in Kartoffelknollen infolge von Transplantation und über die Grenzen der Verwachsung nach dem Verwandtschaftsgrade; Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 1906, S. 428

E. Strasburger, Ueber Verwachsung und deren Folgen; Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 1885, S. XXXIV,

E. Strasburger, Zu dem Atropinnachweis in den Kartoffelknollen; Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 1906, S. 599.

V. Grafe und K. Linsbauer, Ueber die wechselseitige Beeinflussung von *Nicotiana Tabacum* und *N. affinis* bei der Pflopfung; Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 1906, S. 366.

¹⁾ Es ist dabei zu beachten, daß in der Literatur Angaben vorliegen, daß der Muskarinstillstand auch durch andere Stoffe, wie Guanidin, Camphor, Veratrin, Digitalin usw. aufgehoben werden könne, sodaß es nicht ganz sicher ist, daß der Stillstand wirklich durch Hyoscyamin herbeigeführt wurde.