

Mikrochemischer Nachweis und Lokalisations-Ermittlung von Glykosiden.

Von **L. Rosenthaler.**

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Bern.)

(Eingelangt am 10. Juni 1929.)

Der mikrochemische Nachweis von Glykosiden lehnt sich eng an den makrochemischen an und ist von verschiedener Sicherheit, je nachdem es sich um den Nachweis eines bereits in reinem Zustand isolierten Glykosids, um den Nachweis eines unreinen oder in einem Gemisch befindlichen Glykosids oder gar um den Nachweis in einem pflanzlichen Schnitt oder einem Pflanzenpulver handelt. Im ersten Fall wird die Kombination von physikalischen (Mikroschmelzpunkt, Bestimmung des Kristallsystems, Brechungsindex) und chemischen Methoden rasch mit Sicherheit zum Ziele führen, in den beiden anderen Fällen wird der Nachweis mit Sicherheit in vielen Fällen nur dann gelingen, wenn bereits durch makrochemische Untersuchungen feststeht, daß das mikrochemisch nachzuweisende Glykosid vorhanden ist, ein Fall, der in der Regel bei der Aufgabe der Lokalisationsermittlung vorliegt.

Von den auch mikrochemisch geeigneten Verfahren zum Nachweis von Glykosiden seien folgende erwähnt:

I. **Hydrolyse mit nachfolgendem Nachweis des Aglykons.** Die Hydrolyse kann vorgenommen werden: 1. durch Enzyme; 2. durch Kochen mit Säuren; 3. durch Mikrosublimation.

1. Besonders elegant fällt der mikrochemische Nachweis durch enzymatische Hydrolyse in jenen Fällen aus, in denen, wie bei den Blausäure- und Senfölglykosiden das Aglykon flüchtig ist; von anderen Fällen sei der **WASICKY'sche** Nachweis von Oxymethylanthrachinonglykosiden mit Hilfe des Rhabarber-Enzyms erwähnt.

2. Die Hydrolyse mit Säuren wird dann herangezogen werden, wenn das Aglykon in Wasser unlöslich ist, z. B. bei Salicin, den Saponinen, Digitalis- und Strophanthus-Glykosiden.

3. Ein während der Mikrosublimation zerfallendes Glykosid ist das Arbutin. Es ist leicht, sein Aglykon Hydrochinon in den Sublimaten nachzuweisen¹⁾.

¹⁾ Eine Mikrosublimation unzersetzter Glykoside ist wohl bei gewöhnlichem Druck ausgeschlossen, dürfte aber bei sehr niedrigem Druck zu erreichen sein.

II. Farbenreaktionen.

1. Allgemeine Kohlenhydratreaktionen (z. B. die MOLISCH'sche Reaktion mit α -Naphthol und Schwefelsäure) sind selbstverständlich nur in solchen Fällen zu verwenden, in denen Kohlenhydrate völlig ausgeschlossen sind, um so mehr, da sie hohe Empfindlichkeit besitzen.

2. Spezielle Reaktionen.

a) Reaktionen mit konzentrierter Schwefelsäure mit Zusätzen (Ammonmolybdat, Ammonvanadat, selenige Säure und dergl.) oder ohne solche werden sehr häufig angewandt und sind in vielen Fällen brauchbar, so beim Nachweis von Salicin, Strophanthin und den Saponinen.

b) Reaktionen mit Alkalien: Beispiel die BORNTRÄGER'sche Reaktion, angewandt auf Oxymethyl-anthrachinonglykoside.

c) Reaktionen mit Ferrichlorid. Sie finden Verwendung zum Nachweis von Phenolglykosiden, sind aber meist nicht empfindlich genug, um mikrochemisch verwendet werden zu können.

d) Salpetersäure wurde von TUNMANN zum Nachweis von Arbutin verwandt.

III. Fällungsreaktionen.

1. Allgemeine Fällungsmittel. Die allgemeinen Alkaloidfällungsmittel (Tannin, Brombromwasserstoff, Silikowolframsäure und dergleichen) fällen auch viele hochmolekulare Glykoside; dieselben Glykoside lassen sich auch zum Teil mit Ammonsulfat aus ihren wässrigen Lösungen ausfällen.

2. Spezielle Fällungsmittel.

a) Metallsalze, Erdalkalien und dergleichen können zur Fällung von Glykosiden mit sauren Eigenschaften dienen, so Bleiessig oder Barytwasser zur Fällung vieler Saponine.

b) Sterine können zur Fällung von Digitonin und einigen anderen saponinähnlichen Glykosiden verwendet werden.

c) Nitrosodimethylanilin kann in einzelnen Fällen zur Fällung von Phenolglykosiden herangezogen werden. Beispielsweise gibt Arbutin damit ein sehr charakteristisches Additionsprodukt.

d) Überführung in schwer lösliche Derivate des Glykosids oder Aglykons. Hierher gehört unter anderem der Nachweis des Aesculins mit Hilfe von Chlor- oder Bromderivaten.

IV. Biologische Reaktionen. Genannt sei die Auflösung roter Blutkörperchen, die sich bei Abwesenheit anderer

hämolyzierender Stoffe zum mikrochemischen Nachweis hämolyzierender Glykoside verwenden läßt.

Trotz der zahlreichen im Vorhergehenden skizzierten Hilfsmittel zum mikrochemischen Nachweis von Glykosiden ist die *Ermittlung der Lokalisation der Glykoside*, also ihr Nachweis an ihrem ursprünglichen Ort in der Zelle noch mit vielen Schwierigkeiten verknüpft.

Am einfachsten liegt die Sache, wenn ein Glykosid in der lebenden Zelle bereits auskristallisiert, wie dies BRUNSWIK bei *Anthurium Binotii* beobachtet hat; auch in denjenigen Fällen, in denen die Glykoside beim Austrocknen der Pflanzenteile kristallisieren, wie so oft in der Hesperidingruppe, dürfte der Ort der Kristalle identisch sein mit dem des ursprünglich gelösten Stoffes. Nicht ganz so sicher ist dies, wenn die Überführung in den festen Zustand durch Weingeist und dergleichen geschieht. Im übrigen bietet gerade die Gruppe der Hesperidine ein Beispiel dafür, wie falsch es ist, aus dem Aussehen solcher Kristalle und einigen oberflächlichen Reaktionen auf die Gegenwart eines bestimmten Glykosides zu schließen. Denn die meisten der so als Hesperidin angesprochenen Kristalle haben sich nicht als Hesperidin erwiesen. In manchen Fällen lassen sich kristallinische Fällungen in der Zelle auch durch plasmolysierende Mittel erzielen. Aber auch, wenn dies nicht der Fall ist, wendet man die Plasmolyse häufig als vorbereitende Maßnahme an, da dadurch die Lokalisationsermittlung mit Hilfe spezifischer Reagenzien erleichtert und sicherer wird. In allen Fällen, in denen die Ermittlung der Lokalisation durch chemische oder biologische Reaktionen versucht wird, müssen Kontrollproben mit Schnitten vorgenommen werden, in denen das Glykosid durch ein geeignetes Lösungsmittel (in der Regel genügt wiederholtes Auskochen mit verdünntem Weingeist) entfernt wurde. Nur so ist es einigermaßen möglich, sich vor Irrtümern zu schützen. Überhaupt muß darauf hingewiesen werden, daß einwandfreie Lokalisationsermittlungen durchaus nicht so leicht sind, wie sich dies manche Autoren vorstellen. Ganz abgesehen von der durch LIESEGANG behandelten Frage, ob man berechtigt ist, aus dem Ort einer im kolloiden Medium erzeugten Fällung auf den ursprünglichen Ort des gefällten Körpers zu schließen, liegen auch in der Art der Reaktionen nicht

wenige Fehlerquellen. Darauf wird auch in den weiteren Ausführungen hingewiesen werden.

I. Hydrolyse mit nachfolgendem Nachweis des Aglykons. Unter den hier vorliegenden Möglichkeiten kommt für die Lokalisationsermittlung in erster Linie die enzymatische Hydrolyse in Betracht. Sie ist beispielsweise von ROSENTHALER und SEILER zum Nachweis der Lokalisation von Blausäureglykosiden verwendet worden, indem sie die frei werdende Blausäure auf mit ein wenig Jod imprägnierte Stärkekörner einwirken ließen.

II. Von den Farbenreaktionen sind die vielfach angewandten allgemeinen Kohlenhydratreaktionen völlig abzulehnen, da sie eben außer mit den Glykosiden mit den stets vorhandenen Kohlenhydraten reagieren. Auch die Reaktionen mit konzentrierter Schwefelsäure führen infolge des Eintretens der RASPAIL'schen (Kohlenhydrat-Eiweiß-Reaktion) häufig zu Irrtümern. Auch dadurch ist die konzentrierte Schwefelsäure wenig zu Lokalisationsermittlungen geeignet, daß sie die Stoffe rasch herauslöst und so die Färbungen auch in Zellen auftreten läßt, in denen das Glykosid nicht ursprünglich vorhanden war und außerdem dadurch, daß sie zarte Schnitte rasch zerstört. Die zuletzt genannten Nachteile lassen sich in vielen Fällen dadurch vermeiden, daß man die Schwefelsäure mit Wasser oder Weingeist verdünnt. So verwendet man zum Nachweis des Strophanthins eine 80%ige Schwefelsäure; bringt man einen Schnitt durch das Rhizom von *Polygonatum multiflorum* in ein Gemisch gleicher Teile Weingeist und Schwefelsäure, so sieht man, daß einzelne Zellen sich rot färben, während bei Anwendung konzentrierter Schwefelsäure größere Partien des Rindengewebes diese Färbung zeigen. Bei den Reaktionen mit Alkalien ist es häufig von Vorteil, hochkonzentrierte Laugen, besonders auch weingeistige, zu verwenden, da dann die Möglichkeit vorliegt, daß die Farbenreaktion an der schwerlöslichen Alkaliverbindung eintritt. Noch sicherer ist die Verwendung von gasförmigem Ammoniak. Reaktionen mit Ferrichlorid sind in allen denjenigen Fällen zur Bestimmung der Lokalisation von Glykosiden ungeeignet, in denen noch andere mit Ferrichlorid reagierende Stoffe, besonders die so weit verbreiteten Gerbstoffe zugegen sind.

Auch die Anwendung von Salpetersäure ist, soweit man sie durch Nitrierung zur Erzeugung gelb gefärbter Derivate verwenden will, mit Vorsicht zu beurteilen, da sich derartige Stoffe

bekanntlich aus zahlreichen aromatischen Derivaten bilden; doch kann man sich auch hier in manchen Fällen dadurch helfen, daß man eine verdünnte Salpetersäure verwendet.

III. Von den Fällungsreagenzien sind die allgemeinen Alkaloidfällungsmittel auch bei Abwesenheit von Basen nur mit großer Vorsicht zu benutzen, da sie außer den bereits erwähnten höheren Kohlenhydraten auch Eiweißstoffe ausfällen. Doch sind sie in eiweißarmen, aber glykosidreichen Zellen mit Erfolg anzuwenden; daß auch Fällungen mit Ammonsulfat oder anderen Neutralsalzen kritisch beurteilt werden müssen, bedarf keiner weiteren Erörterung.

Von den speziellen Fällungsmitteln sind weder Metallsalze noch Erdalkalien spezifische Glykosidfällungsmittel, da sie ja auch mit organischen Säuren schwerlösliche Salze bilden können. Bei deren Abwesenheit sind sie in vielen Fällen recht geeignet, so zum Nachweis der Lokalisation von Saponinen durch das Verfahren von COMBES. Sollen Schwermetallverbindungen von Glykosiden indirekt nachgewiesen werden, etwa dadurch, daß man sie nach Auswaschen des Reagens in Sulfide oder andere gefärbte Metallverbindungen überführt, so wirkt es häufig störend, daß manche Elemente der Gewebe, so schon die Zellulosewände Schwermetalle adsorbieren.

Die Fällungen mit Sterinen geben, soweit mir bekannt, in chemischer Hinsicht nicht zu Irrtümern Veranlassung; ihre Verwendung zur Lokalisationsermittlung ist jedenfalls mit Vorsicht zu beurteilen, da die Doppelverbindungen beim Nachweis von Sterinen mit Digitonin auch am Rand der Schnitte zu beobachten sind und wohl auch im umgekehrten Fall damit gerechnet werden muß, daß die Verbindung nicht am ursprünglichen Ort auftritt.

Nitrosodimethylanilin gibt auch Fällungen mit Gerbstoffen, ist also, wenn solche anwesend sind, nicht zu verwenden.

Die Überführung der Glykoside in Halogen-derivate kann zur Lokalisationsermittlung dann mit Sicherheit herangezogen werden, wenn die Halogene in gasförmigem Zustand verwendet werden.

Bei der Verwendung der Hämolysen ist es ausgeschlossen, den Nachweis der Lokalisation für die einzelne Zelle zu führen; sie gestattet aber bei Verwendung von Blutgelatine (KOFLEK,

FISCHER) den Nachweis in einzelnen abtrennbaren Gewebekomplexen.

Ein Fortschritt über das bisher Erreichte hinaus dürfte weniger auf chemischem als auf mechanischem Gebiete zu erreichen sein, besonders durch Verwendung des Mikromanipulators. Gelingt es, mit dessen Hilfe einzelne Zellen oder sehr kleine Zellkomplexe zu isolieren, so lassen sich zur Ermittlung der Lokalisation — dies gilt nicht nur für Glykoside — manche bisher nicht mit Sicherheit zu verwendende Reagenzien gebrauchen und das ganze Gebiet wird eine zuverlässige Grundlage erhalten.
