©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zum Nachweis kleinster Saponinmengen

Von

Robert FISCHER und Maria WYBIRAL

(Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Graz)

Mit 5 Abbildungen

Eingelangt am 16. Jänner 1950

Seit der Bekanntgabe der Blutgelatine-Methode zum Nachweis von Saponin durch KOFLER 1927 : 83, FISCHER 1928 : 25, 1930 : 321, FISCHER und BERTHOLD 1933 sind über 20 Jahre verflossen und es erscheint angemessen, über neue Erfahrungen, Verbesserungen und Fehlerquellen zu berichten.

Divergenzen in den Literaturangaben über den Saponingehalt einiger Pflanzen, bzw. Drogen, veranlaßten uns zu den folgenden Untersuchungen. Es handelt sich hier um sehr schwach hämolytisch wirksame Saponine oder um geringste Mengen neben viel hämolytisch unwirksamen Glykosiden. Bei der Methode der Blutgelatine scheinen im Reaktionsverlauf zwei mehr oder minder variable Bedingungen auf: Das Reagens Blut, verschieden nach Alter, Tierart usw. und dann die lebende Pflanze mit ihren Verschiedenheiten im Stoffwechsel je nach Wachstumsbedingungen und Varietät. Es ist daher unter diesen Umständen begreiflich, wenn an der Grenze der Leistungsfähigkeit einer solchen Methode Differenzen auftreten. Wir haben uns im folgenden bemüht, die außerhalb der genannten Variablen liegenden Fehler nach Möglichkeit zu verkleinern und die Beobachtung der Reaktion einwandfrei zu gestalten.

Teil I

(Pflanzen mit Saponinen, die sehr schwach hämolytisch wirken oder die mäßig wirksam, jedoch in geringsten Mengen vorhanden sind.)

Drogen mit schwachwirksamen Saponin geben im Schnitte selbst zuweilen nur eine sehr geringe, oft gar keine Haemolyse mehr und man nimmt hier bekanntlich Zuflucht zu Konzentraten, indem man die gepulverte Droge oder die trockene Pflanze mit Methanol im Verhältnis etwa 1 : 10 extrahiert, heiß filtriert und dann mit dem dreifachen Volumen Äther fällt. Die ausfallenden hellen Flocken werden, bevor sie zu klebrig werden, in einem Glasfilterrohr abgenutscht und mit Äther gewaschen, wobei man beachten muß, daß die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit nie völlig eingesaugt wird. Nach Beendigung des Waschens *evaquiert* man das Rohr oder saugt trockene Luft durch. (Die

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Fällung kann zur Reinigung nochmals in Methanol gelöst und mit Äther gefällt werden.) Beim Liegen an der Luft oder beim Durchsaugen feuchter Luft werden die Substanzen meist rasch braun und klebrig. Sie sind durchwegs stark hygroskopisch. Bezüglich der Extraktion der Saponine mit Methanol sei darauf hingewiesen, daß einzelne Saponine in konz. Alkohol ziemlich schwer löslich sind und nur teilweise aus der Droge extrahiert werden. (Man kann z. B. aus konz. wäßrigen Auszügen von Saponinpflanzen durch Alkoholzusatz Saponin fällen.) Wasser, bzw. verdünnter Methanol oder Aethanol lösen an sich viel besser. Die Fällung mit Äther, die nur bei konz. Alkohol, bzw. Methanol möglich ist, bietet jedoch ein einfaches Mittel, eine Konzentrierung des Saponins zu bewirken, sodaß es wohl zweckmäßig ist, trotz der erwähnten Nachteile, sich dieses Verfahrens zu bedienen.

Legt man die so erhaltene Substanz nach dem Vorgange von JARETZKY und LINDNER 1939 : 45 direkt in Blutgelatine [1]) ein, so kann unter Umständen wohl ein hämolytischer Hof erhalten werden. Meistens zerfließen die hygroskopischen Substanzen bei der Berührung mit der Blutgelatine rasch und können dabei Haemolyse vortäuschen oder erschweren ihre Feststellung außerordentlich. Am Objektträger verbleibt in den meisten Fällen an der Stelle der aufgetragenen Substanz nur ein blutkörperchenfreier Flecken mit einigen Luftblasen, der nicht immer mit Sicherheit erkennen läßt, ob er von einer Haemolyse herrührt oder nur durch Zurückdrängen der Blutkörperchen durch die sich auflösende Substanz entstanden ist. Es erscheint daher zweckmäßiger, anstelle der Substanz mit ihr getränkte Filterfleckchen nach dem Trocknen in Blutgelatine einzulegen, wie es FISCHER und BERTHOLD 1933 erstmalig im Modellversuch mit reiner Saponinlösung getan haben. Auch ROBERG 1937 a : 145 gebrauchte zum Nachweis von Saponin in *Equisetum arvense* getränkte Filterpapierstückchen. Wegen der schwachen Haemolysewirkung dieser Saponine wurden die Filterstückchen möglichst stark mit den hochkonzentrierten Lösungen der Substanzen getränkt. In mäßiger Wärme werden nach Verdunsten des Lösungsmittels die Scheibchen getrocknet. Hierauf werden die Filterchen in Blutgelatine eingelegt. Entsteht um das Filter ein heller Hof, so wird zur Feststellung einer etwaigen Haemolyse das Präparat unter dem Mikroskop geprüft. Wichtig! Siehe weiter unten. Nach 24 Stunden wird im allgemeinen die Beobachtung beendet.

Die haemolytische Natur der auftretenden Höfe erschien fraglich, wenn im Hofe selbst vereinzelte Blutkörperchen erhalten blieben oder

---

[1]) Wir verwenden meist defibriniertes Rinderblut, es dürfte sich jedoch empfehlen, in fraglichen Fällen mehrere Blutsorten, z. B. Ratten-, Meerschweinchen- und Hammelblut und auch gewaschene Blutkörperchen zu benützen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

wenn volle Verflüssigung der Gelatine rings um das Filterchen eintrat. Zur Entscheidung stellten wir Parallelversuche mit Reisgelatine an.

Die Reisgelatine wurde durch sorgfältiges Verreiben der verflüssigten Gelatine mit Reisstärke hergestellt, wobei angestrebt wurde, daß die Konzentration der Stärkekörner möglichst der Konzentration der Blutkörperchen im Hauptversuche entsprach. Verursachten in die Reisgelatine eingelegte, mit der untersuchten Substanz getränkte Filterscheibchen das gleiche Erscheinungsbild wie in der Blutgelatine, so erschien damit eine haemolytische Wirkung der Substanz vorerst als unwahrscheinlich. Eine beobachtete Hofbildung im Hauptversuch war dann auf Verflüssigung der Gelatine oder andere Veränderungen oder auf Vorliegen von Schleim zurückzuführen. Trat nur im Hauptversuch eine Hofbildung ein, so lag einwandfrei Haemolyse vor. Ob diese durch Saponin bedingt war, mußte erst noch durch den Cholesterin-Versuch erwiesen werden.

Bei der Untersuchung von Pflanzen wurden Konzentrate auch nach einem von FISCHER und BERTHOLD 1933 bekanntgegebenen Verfahren geprüft. Auf einen Objektträger werden vier Deckglassplitterchen in einem Quadrat aufgelegt; in dessen Mitte gibt man so viel Blutgelatine, daß nach dem Bedecken mit dem Deckglas der Raum zwischen Objektträger und Deckglas knapp mit Blutgelatine ausgefüllt ist. An die Deckglaskante, bei der die erstarrte Blutgelatine mit dem Deckglasrand am gleichmäßigsten abschneidet (Lupe!), bringt man einige Tropfen der Untersuchungsflüssigkeit, in unserem Falle meist in 0,9% Kochsalzlösung gelöste Extrakte aus der Droge, deckt darüber ein zweites Deckglas, das in einiger Entfernung von Deckglassplitterchen gestützt ist, so daß die eine Hälfte die Flüssigkeit, die andere das Deckglas bedeckt. Die Flüssigkeit verteilt sich nun unter dem zweiten aufgelegten Deckglas und kommt mit der ganzen Länge der Deckglaskante und somit auch der darunterliegenden Blutgelatine in Berührung. Unter dem Mikroskop beobachtet man nach einiger Zeit, daß bei Anwesenheit von Saponin die Blutkörperchen vom Rande her aufgelöst werden. Mit einem Okularmikrometer kann die blutkörperchenfreie Zone gemessen und der Versuch so quantitativ ausgewertet werden.

Da außer den Saponinen auch andere Stoffe haemolytisch wirken können, muß Saponin noch durch die Bindung an Cholesterin entgiftet und aus dem Cholesterid durch Spaltung wieder regeneriert werden: FISCHER 1930. Zur Entgiftung werden die getränkten Filterstückchen in einem Reagenzglas mit aufgesetztem Kühler in einer heiß gesättigten Cholesterinlösung gekocht, hernach mit leichtsiedendem Petroläther oder Äther ganz kurz gewaschen, um den Cholesterinüberschuß zu entfernen, dieser durch leichtes Erwärmen vertrieben und einige der Filterchen in Blutgelatine eingelegt. Liegt ursprünglich nur Saponin und kein anderer haemolytisch wirkender Stoff vor, so unterbleibt nunmehr die

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Haemolyse. In diesem Falle wird der Rest der Filterchen zwei Stunden mit Xylol in einer Eprouvette mit aufgesetztem Steigrohr gekocht und dadurch die Additionsverbindung gespalten. Nach Waschen mit Äther bzw. Petroläther und Trocknen geben die Filterscheibchen in Blutgelatine eingelegt erneute Hofbildung, wodurch Saponin einwandfrei nachgewiesen erscheint.

Abgesehen davon, daß wir möglichst stark getränkte Filterchen verwenden müssen, ist bei der Entgiftung folgendes zu beachten:

1. Es müssen verschiedene Lösungsmittel für Cholesterin versucht werden. — Anfänglich schienen die von FISCHER 1930 vorgeschlagenen Lösungsmittel wie Äther-Alkohol, 90%iger Alkohol, Äther, auszureichen. Im Verlauf weiterer Untersuchungen wurden Saponinpflanzen gefunden, bei denen das Saponincholesterid z. B. in Alkohol und Äther leicht spaltbar ist; daher kommt keine völlige Entgiftung zustande. JARETZKY u. LINDNER 1939 empfehlen hier Methanol. Es dürften jedoch auch andere Lösungsmittel wie z. B. Aethylacetat brauchbar sein, nur empfiehlt es sich, den Cholesterin-Überschuß mit Petroläther oder nach den Erfahrungen von FOERSTERLING 1941: 21 mit Chloroform zu entfernen.

2. Bei xylollöslichen Saponinen — wie sie LINDNER 1943: 181 in einer Reihe von Gräsern auffand — hat die Spaltung des Cholesterids zweckmäßig mit B e n z o l zu erfolgen. — FOERSTERLING 1941 hat ausführlich auf die Leistung der verschiedenen Lösungsmittel bei der Cholesteridspaltung im Filter hingewiesen. Wir glauben für qualitative Zwecke mit Benzol im allgemeinen das Auslangen zu finden. Über Cholesteridspaltung berichtet auch BREITWIESER 1942: 157—158. Man schmilzt die Filter mit Benzol in eine starkwandige Eprouvette ein und erhitzt unter Umschütteln auf 145°—150° (Trockenschrank), da erst bei dieser Temperatur das Cholesterid dissoziiert. Nachher wäscht man dreimal mit Äther oder leichtsiedendem Petroläther und trocknet. Es ist von Vorteil, daß etwaige Reste von Benzol viel rascher als Xylol abdunsten, somit ein Zurückbleiben des Spaltungsmittels praktisch unmöglich ist und das Auftreten einer hierdurch bewirkten Haemolyse wegfällt: FISCHER und BERTHOLD 1933. Wird also nach dem Einlegen der behandelten Filterchen in Blutgelatine Haemolyse beobachtet, so ist mit Sicherheit auf das Vorliegen von Saponin zu schließen. Im entgegengesetzten Fall ist die mit dem Rohextrakt beobachtete Haemolyse auf andere Stoffe zurückzuführen. Als Beobachtungszeit haben sich 24 Stunden als hinreichend erwiesen.

Unterbleibt bei dem Vorversuch mit dem Rohextrakt die Bildung eines schön ausgeprägten Hofes, so ist mit der Kapillaranalyse bzw. Asbestscheibchenmethode weiter zu prüfen; siehe Teil II, S. 85 ff.

Im folgenden sind die von uns untersuchten Pflanzen nach ihrem Verhalten in Gruppen eingeteilt:

I. Pflanzen, die beim Einlegen in Blutgelatine keine oder nur ganz schwache Haemolyse geben; die Konzentrate sind jedoch wirksam und erlauben den einwandfreien Nachweis von Saponin: *Carex*

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

arenaria, Viola tricolor, Taraxacum officinale, Salvia officinalis, Equisetum arvense, Pulmonaria officinalis.

II. Pflanzen, bei denen beim Einlegen der Droge selbst oder des Konzentrates (Filter) infolge von Gelatine-Verflüssigung oder von Schleimstoffen Pseudohaemolyse auftritt: *Agropyron repens, Pimpinella, Plantago, Symphytum officinale, Urginea maritima* und (*Trifolium*?).

III. Pflanzen, bei denen die Droge einen haemolytischen Hof gibt, ihr Extrakt jedoch keinen: *Rhamnus Frangula.*

IV. Pflanzen, deren haemolytisch wirkender Stoff vermutlich kein Saponin ist: *Adonis vernalis.*

Anhangsweise wurde die Untersuchung von Organextrakten unter Hinweis auf Fehlerquellen behandelt.

Die Befunde bei den einzelnen Drogen sind im folgenden schlagwortartig zusammengestellt:

Gruppe I

Carex arenaria. Wurzel: Droge unwirksam nach KOFLER u. STEIDL 1934: 300, ebenso bei unseren Versuchen. Ätherfällung weißliche Flocken, hygroskopisch. Auf Filtern nach 40 Min. Haemolyse. Entgiftung erfolgt durch einstündiges Kochen mit Aceton-Cholesterin, Regeneration mit Xylol positiv. Asbestscheibchen positiv (Methodik siehe S. 85 ff.). Einwandfreies Saponin, siehe dazu FREISE 1938: 49—51.

Viola tricolor. Kraut: Nach KROEBER 1922: 574, 1925 a: 338, 1933: 337, ROBERG 1937 a: 145 schwach positive Reaktion in der Droge. Ätherfällung auf Filter nach 30 Min. deutliche Haemolyse, nach 14 Stunden daneben zarte braune Fällung (Gerbstoff?). Entgiftung und Regeneration einwandfrei, Asbestscheibchen positiv (mit Benzol gespalten), Saponin nachgewiesen.

Taraxacum officinale. Wurzel: Nach KROEBER 1925 b: 93, 1927 b: 735, KOFLER und STEIDL 1934: 300, ROBERG 1937 a: 145 negativ. Droge ganz geringe Haemolyse. Ätherfällung weißlich, zweimal umgefällt, auf Filter starke Haemolyse nach 15 Min., die Entgiftung mit Aethanol-Äther, Methanol-Äther-Cholesterin, es gelingt die Regeneration nur mit Benzol! Auch Asbestscheibchen positiv. Saponin sichergestellt.

Equisetum arvense. Kraut: Saponin nach CASPARIS und HAAS 1930—1931: 62, 181, ROBERG 1937 a: 145. Droge keine deutliche Haemolyse. Hammelblut nötig! Ätherfällung auf Filterpapier: Haemolyse gut sichtbar, daneben körnige Fällung. Entgiftung mit Äther und Äther-Alkohol-Cholesterin und Regeneration auch mit Xylol positiv, ebenso Asbestscheibchen, einwandfrei für positiven Befund.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Pulmonaria officinalis. Kraut: KROEBER 1927a: 23 fraglich, ROBERG 1937 a: 145 negativ. Ätherfällung grünbraun, hygroskopisch. Filter in Blutgelatine eigenartige Zonen mit verklumpten Blutkörperchen nach Art der LIESEGANGschen Ringe, dazwischen Verflüssigung, blutkörperchenfreie Zone (Haemolyse?) auch feinkörnige Fällungen treten auf. In Reisgelatine ähnliches Bild, es fehlt jedoch die blutkörperchenfreie Zone! Entgiftung mit Aceton- und Methanol-Cholesterin und Spaltung mit Benzol gibt positives Resultat. Asbestscheibchen nach 1,5 Stunden deutlich, wenn auch schwach positiv. Saponin nachgewiesen.

Salvia officinalis. Blätter: KOFLER und STEIDL 1934: 300 negativ. BALANSARD 1934, 1936 will ein neutrales und saures Saponin gefunden haben, nimmt aber dann seine Befunde zurück. BUDISCHOWSKI 1938 fand eine acetonlösliche und eine acetonunlösliche nicht haemolytische Fraktion. Erstere extrahierten wir noch mit Methanol und erhielten ein gerbstoffärmeres Produkt, das nach Fällung mit Äther auf Filterpapier nach 30 Min. Haemolyse zeigte. Asbestscheibchenmethode mit dieser Substanz fiel auch positiv aus. Schwachwirksames Saponin.

Gruppe II (Pseudohaemolyse)

Agropyron repens. Wurzel: KOFLER und STEIDL 1934: 300 negativ, übliche Fällung, fadenziehend, klebrig. Um das Filter heller unregelmäßiger Hof mit Verflüssigung, auch bei erstarrter Gelatine, siehe Abb. 1. Reisgelatine analoges Bild. Kein Saponin, Verwechslungsmöglichkeit gegeben!

Pimpinella saxifraga. Wurzel: KOFLER und STEIDL 1934: 300 schwache Haemolyse, keine Entgiftung. Ätherfällung gelbweiß, leichtlöslich. Filter: unregelmäßige Höfe, Verflüssigung, Blutkörperchen neben dem Filter, Reisgelatine analog. Kein Saponin!

Plantago lanceolata und *major.* Kraut: PATER 1925 kein Saponin, KROEBER 1934/35 glaubt Saponin nachgewiesen zu haben, FUCHS 1932: 29 und ROBERG 1937 b: 145 negativer Befund. Wir beobachteten bei der braunen leichtlöslichen Ätherfällung am Filter unregelmäßige Höfe und zwei Zonen wolkiger Fällungen, dazwischen Verflüssigung, Reisgelatine analoges Bild. Kein Saponin.

Symphytum officinale. Wurzel: ROBERG 1937 b: 145 kein Saponin. In der Droge Schleim, der am Rand des Schnittes (in Gelatine) austritt, Ätherfällung gelbbraun hygroskopisch, „Pseudohaemolyse", siehe Abb. 2, Verflüssigung und Absinken ebenso auch bei Reisgelatine. Kein Saponin.

Urginea maritima. Droge Bulbus Scillae: Am Rand des Schnittes Austritt von Schleim, Vorwölbungen von einer Art Membran begrenzt,

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

an dieser deutlich Anreicherung von Blutkörperchen als Zeichen der erfolgten Verdrängung sichtbar. Kein Saponin.

Trifolium pratense. Kraut und Wurzel: KROEBER 1934/35 glaubt geringe Haemolyse festgestellt zu haben. ROBERG 1937 b: 145 negativer Befund. JARETZKY und LINDNER 1939: 45 finden in den oberirdischen Teilen Saponin. Kraut: Ätherfällung weißlich, wird

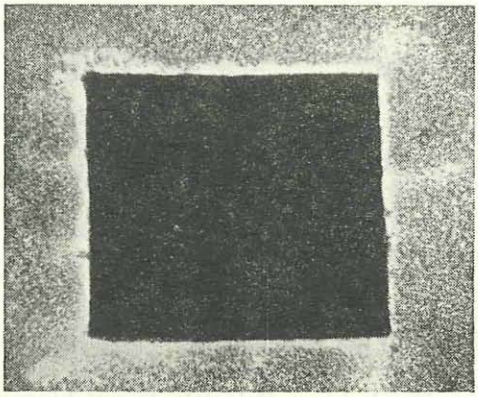
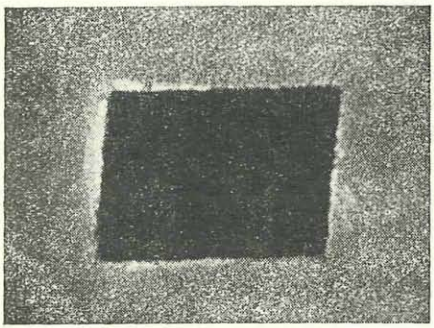


Abb. 1: Filter mit Extrakt aus der Wurzel von *Agropyron repens* in Blutgelatine. Vergr. 8×.



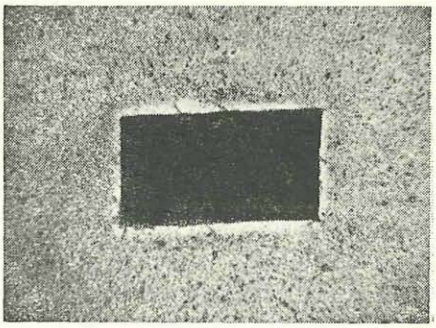


Abb. 2 (links): Filter mit Extrakt aus der Wurzel von *Symphytum officinale* in Blutgelatine. Vergr. 8×.

Abb. 3 (rechts): Filter mit Extrakt aus dem Kraut von *Trifolium pratense* in Reisgelatine. Vergr. 8×.

bald braun, noch mehrmals umgefällt. Filter: makroskopisch sichtbare Höfe, ebenso in Reisgelatine, siehe Abb. 3, mikroskopisch jedoch noch Blutkörperchen nahe dem Filter. Absinken und Abwandern von Blutkörperchen infolge Verflüssigung der Gelatine,

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

auch dann, wenn diese in erstarrtem Zustand auf das Filter gedrückt wurde. Asbestscheibchenmethode negativ. Das Kraut nach unseren Versuchen frei von Saponin. — Wir prüften außer dem Kraut noch die Wurzel, weil wir nach dem Mißerfolg beim Kraut vermuteten, der positive Befund von JARETZKY und LINDNER 1939 könnte durch die Beimengung von etwa saponinhaltigen Wurzeln bedingt sein. Wurzel: Ätherfällung Flocken, rasch braun. Am Filter nach 3 Stunden deutlicher haemolytischer Hof. In Reisgelatine die Stärkekörner zum Teil abgesunken. Entgiftung mit Methanol-, Aceton-, und Äther-Cholesterin nicht immer einwandfrei. Nach Benzolspaltung makroskopisch deutlicher Hof, unter dem Mikroskop Blutkörperchen nahe dem Filter noch vorhanden. Asbestscheibchenmethode negativ. Auch Versuche nach FISCHER-BERTHOLD 1933 mit konz. Lösung auf dem Objektträger) zweifelhaft. Saponingehalt fraglich.

Es besteht wohl noch die Möglichkeit, daß abgesehen von der Täuschung durch einen makroskopisch sichtbaren Hof die Differenz unserer Befunde in der Existenz saponinhaltiger und saponinfreier Varietäten von *Trifolium pratense* begründet ist. Uns erscheint es wesentlich, an Hand obiger Beispiele darauf hingewiesen zu haben, daß eine mikroskopische Kontrolle und die Feststellung einer etwaigen Verflüssigung für eine einwandfreie Saponindiagnose unbedingt nötig ist.

Gruppe III

Rhamnus Frangula. Rinde: SOLACOLU und WELLES 1933: 470 haben ein Saponin aus den Früchten isoliert, KOFLER und STEIDL 1934: 300 Haemolyse aber keine Entgiftung. Unsere Ergebnisse Droge: Frische Rinde stärkere Haemolyse als gelagerte. Entgiftung mit Alkohol-Äther und Methanol-Cholesterin gelingt, die Regeneration nicht.

Methanol Extr. + Äther aus gelagerter Droge: ölige Fällung, keine Haemolyse.

Aceton Extr. + Äther aus gelagerter Droge: weiße schwerlösliche Fällung, keine Haemolyse.

Methanol Extr. + Äther aus frischer Droge: weiß-braune Fällung leichtlöslich, keine Haemolyse.

Die in der frischen Droge vorhandene haemolytische Substanz scheint sich beim Kochen mit Alkohol zu zersetzen und kann kaum als Saponin angesprochen werden.

Gruppe IV

Adonis vernalis. Kraut: Saponin angeblich nachgewiesen durch: WASICKY 1932, FUCKELMANN 1911: 267, 315, SOLACOLU und WELLES 1933: 470, KUHN und SCHÄFER 1935: 257; Saponin

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

wird negiert von: LUFT 1926: 259, OBERGFELL 1926, FISCHER 1928, GILG und SCHÜRHOFF 1932: 217, KOFLER und STEIDL 1932, 1934 und ROBERG 1937 a. Ätherfällung braun hygroskopisch, starke Haemolyse nach etwa 15 Stunden. Entgiftung mit Methanol-Cholesterin, keine Regeneration, Asbestscheibchen negativ. Saponin unwahrscheinlich.

Anhang

Bei Versuchen mit Auszügen aus Organen ist zu beachten, daß selbst bei einem positiven Haemolysebefund ohne Entgiftung nicht ohne weiters auf Saponin in den verwendeten Organextrakten oder in den Organen selbst geschlossen werden darf. Denn solche Extrakte enthalten unter Umständen Amine, die durchwegs starke Haemolyse bewirken, wie z. B. n-Butylamin, Methylamin, Isobutylamin, Allylamin und Amylamin. In den Leberextrakten sind überdies noch Gallensäuren vorhanden, die — wie bekannt — gleichfalls stark haemolysieren; wir konnten uns von der starken Wirkung der in Leberextrakten enthaltenen Galle überzeugen. Auch die Gelatine-Verflüssigung, die oberflächlich betrachtet Haemolyse vortäuschen kann, ist bei solchen Organextrakten zu berücksichtigen.

Folgendes Beispiel diene zur Illustration des Gesagten:

GORDONOFF und LÜSCHER 1935: 10 gaben an, daß sie bei Kaninchen nach intravenöser und oraler Verabreichung Saponin in der Lunge und Leber nachweisen konnten. Sie kochten die zerkleinerten Organe mit 70%igem Alkohol, filtrierten heiß und dampften zur Trockne ein. Den Rückstand nahmen sie mit physiologischer Kochsalzlösung auf, filtrierten ab und prüften mit Blutgelatine auf Haemolysewirkung.

KOFLER und FISCHER 1936 konnten jedoch diese Angaben nicht bestätigen. Sie erzielten bei der Wiederholung der GORDONOFF-LÜSCHERschen Versuche keine Haemolyse. Selbst wenn von den Versuchstieren das Saponin resorbiert und in Organen angereichert würde, könnte es in den Organextrakten nach GORDONOFF und LÜSCHER 1935 nicht nachgewiesen werden; denn das in ihnen vorhandene freie Cholesterin macht es durch Cholesteridbildung gegen Blutgelatine wirkungslos, wie diesbezügliche Versuche mit Saponinzusätzen zeigten. Man müßte vorher eine Spaltung mit Xylol vornehmen, wie dies JARETZKY und LINDNER 1939 bei Untersuchungen an Samen erwähnen. Auch Glyzerin erzeugt, auf Filter gebracht, infolge Verflüssigung schmale blutkörperchenfreie Streifen, desgleichen in Reisgelatine. Bei Verwendung erstarrter Gelatine unterbleiben diese Erscheinungen.

Teil II

(Verbesserung des kapillaranalytischen Nachweises von Saponin)

Bei diesem Verfahren wird nach KOFLER-FISCHER-NEWESELY 1929: 685 bekanntlich ein mit einer Cholesterinschranke (Herstellung

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

durch Auftropfen einer Cholesterin-Acetonlösung und Trocknen) versehener Papierstreifen in die zu untersuchende Flüssigkeit getaucht. Aus dieser wird beim Aufsaugen durch das fein verteilte Cholesterin in der Schranke das Saponin heraus gefangen, bzw. darin als Cholesterid gebunden. Die herausgeschnittene Schranke wird mit Xylol oder Benzol gespalten, das Saponin ist dann frei und kann mittels Blutgelatine nachgewiesen werden. Da das Aufsaugen der Flüssigkeit im Filterpapier ziemlich lange Zeit (2—3 Tage) benötigt, versuchten wir mit Erfolg folgende Anordnung:

Die zu untersuchende Flüssigkeit läßt man durch ein am Ende eines Glasrohrs entsprechend befestigtes kleines Asbestscheibchen, das mit Cholesterin getränkt ist, fließen. Regelung des Durchflusses nach Bedarf, es sind höchstens einige Stunden nötig. Die Spaltung des Cholesterins erfolgt nach unseren Erfahrungen am besten durch Erhitzen mit Benzol auf 150°. Es besteht die Möglichkeit, auch mit anderen Lösungsmitteln die Spaltung vorzunehmen, z. B. mit Chloroform, Tetrachlormethan, Toluol. Während beim Chloroform, Toluol und Tetrachlormethan eine Verfärbung des Kapillarstreifens auftritt, die störend wirkt, konnten wir dies bei den Asbestscheibchen nicht beobachten. Saponinnachweis wie oben.

Methode: Aus einer ca. 1 mm dicken Asbestplatte wird mittels Korkbohrer ein Scheibchen von 6,5 mm Durchmesser ausgestanzt. Dieses wird im unteren Teil eines beiderseits offenen Glasrohres von 25 cm Länge und 6 mm Lumen, mit Hilfe eines eingeschobenen kurzen Röhrchens das genau dem Lumen des langen Rohres angepaßt ist, befestigt. Das Scheibchen erhält dadurch eine passende Auflage und es wird ein sattes Anliegen an den Wandungen des Rohres erreicht (siehe Abb. 4). Die beiden Rohre sind durch ein überstülptes Gummischlauchstück fixiert. Die Durchlaufsgeschwindigkeit der Versuchslösung regeln wir durch einen entsprechenden dichten Wattepfropfen im Einschubrohr. Vor dem Einpassen in die Apparatur wird das Scheibchen mit je 3 Tropfen einer 1%igen Äther-Cholesterinlösung auf jeder Seite getränkt, wobei der nächstfolgende Tropfen immer erst nach dem völligen Einsaugen des vorhergehenden aufgetragen werden darf. Zu Trocknen ist ohne Erwärmen, bei Zimmertemperatur und Vermeidung einer Luftbewegung. Diese würde zu unliebsamen Krustenbildungen am Rande des Scheibchens führen, während die Scheibchenmitte dadurch weniger Cholesterin enthält. Die Scheibchen werden hierauf kräftig mit einem steiferen Haarpinsel, zur Entfernung von außen locker anhaftenden Cholesterinteilchen, abgebürstet. Diese könnten bei der weiteren Behandlung leicht abfallen und so mit ihnen an sie gebundene Saponine verloren gehen. Um Verluste und dadurch bedingte Irrtümer zu vermeiden, soll sich deshalb das Cholesterin nur im Innern der Scheibchen und — um eine erhöhte Oberflächenwirkung zu erlangen — in möglichst feiner Verteilung darin befinden. Hierauf schiebt man das Scheibchen von unten ungefähr 2 cm weit in das lange Rohr, zieht ein kurzes Stückchen Schlauch über das untere Ende des Rohres, worauf das kurze Röhrchen mit einem Wattebausch versehen, eingeschoben wird. Nun preßt man mit Hilfe eines Glasstabes, den man von oben in die große Röhre einführt, das Scheibchen gegen das kleine Röhrchen, so daß es am Rande

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

festsitzt und die Flüssigkeit nicht zwischen Scheibchenwand und Glaswand durchlaufen kann. Der Durchmesser des Scheibchens wird zur besseren Abdichtung um ½ mm größer gewählt als das Lumen des Rohres. Bei unseren Untersuchungen von Drogenextrakten erwies es sich als zweckmäßig, über das Scheibchen unbehandelten Asbest locker aufzulegen, der die Verunreinigungen zurückhält und ein Verkleben der Oberfläche des Scheibchens ver-

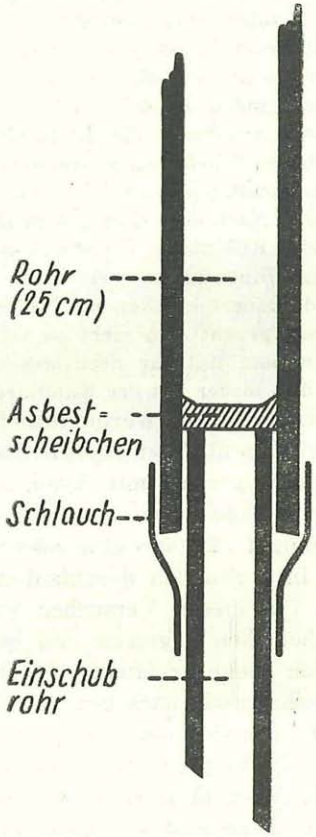


Abb. 4: Erklärung im Text.

hindert. Die Durchlaufszeit für 2 ccm soll 1—2 Stunden betragen. 20 ccm kann man über Nacht leicht durchlaufen lassen. Die Durchlaufszeit ist hiebei durch Lockern des Wattebausches im kurzen Einschubrohr oder durch mehr oder minder festes Abschließen des Filterrohres durch einen Kork (oben) zu regulieren. Hierauf wird zweimal mit je 1 ccm Wasser unter vorsichtigem Ansaugen durchgewaschen. Dann werden die Rohre auseinandergezogen und das nunmehr freiliegende Scheibchen mit einer Pinzette abgehoben. Das Scheibchen wird bei 80° im Trockenschrank getrocknet und hierauf das Cholesterid aufgespalten. Als Spaltungsmittel bewährte sich Benzol im Einschlußrohr am besten. (Auch bei anderen Saponinen dürfte sich die Benzolspaltung

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

bewähren, vielleicht müßte vorher der Cholesterin-Überschuß mit wenig Chloroform (siehe FOERSTERLING 1941) enfernt werden. Chloroformlösliche Saponine sind ja unwahrscheinlich, Pentan oder Petroläther wären sonst am sichersten.) Die Scheibchen sind mit Benzol zwei Stunden im Einschlußrohr (dickwandige Eprouvette) auf 145—150° unter öfterem Schütteln im Heräus-Trockenschrank zu erhitzen. Nach der Aufspaltung werden die Scheibchen mit Äther oder Petroläther gewaschen und bei 80° getrocknet, sodaß jede Spur eines organischen Lösungsmittels entfernt wird. Vor dem Einlegen in Blutgelatine sind die Scheibchen in eine obere und untere Schichte zu spalten, da bei geringen Konzentrationen das Saponin sich lediglich in den obersten Schichten des Scheibchens findet. Es wird dadurch auch die sie umgebende Blutgelatineschicht dünner, wodurch die Empfindlichkeit des Nachweises größer wird. Die gespaltenen Scheibchen sind dann weiter diametral zu halbieren da sich erfahrungsgemäß, wie auch Abbildung 5 zeigt, das Saponin mehr im Innern anreichert. Nach dem Einlegen in Blutgelatine legt man den Objektträger rasch auf eine Kühlplatte. Hierdurch wird ein Verschleppen von Saponin durch die flüssige Blutgelatine verhindert.

Nach dieser Methode dauert ein Saponin-Nachweis bei gutem Arbeiten höchstens einen Tag, beansprucht also nicht so viel Zeit wie die Kapillaranalyse; außerdem kann man mit ihr noch wesentlich geringere Mengen Saponin nachweisen als dies bisher mit der Kapillaranalyse möglich war.

Mit dieser Versuchsanordnung wurde nun eine größere Anzahl von Verdünnungen mit Digitonin als Test geprüft. Es erwies sich hiebei die Spaltung mit Benzol günstiger als mit Xylol. Die Aufnahmefähigkeit eines sauber präparierten Scheibchens liegt bei etwa 80 —100 γ Digitonin (2 ccm einer Lösung 1 : 20.000) eine solche Lösung darf aber nur relativ langsam, etwa in 3 Stunden durchlaufen, sonst findet sich im Filtrat noch Saponin. (In diesen Versuchen wurde eben das Filtrat nochmals über ein Scheibchen gegossen und bei der erwähnten Verdünnung keine Reaktion mehr erhalten.) Die Haemolyse beginnt bei diesen Verdünnungen sehr rasch, nach etwa 2—3 Minuten.

Verwendet man 20 γ das sind bei 20 ccm eine Verdünnung von 1 : 1 Million, (Durchlauf in 12—14 Stunden) so beobachtet man im unteren (II) Scheibchen — wie schon oben erwähnt, werden die Asbestscheibchen der Fläche nach in 2 Teile, den oberen (I) und den unteren (II) zerteilt — nur noch eine geringe und unregelmäßige Haemolyse; manchmal bleibt sie ganz aus. Dies ist leicht erklärlich, es wurde eben das gesamte Saponin bereits in der oberen Schichte gebunden. Trotz der geringen Saponinmenge beginnt die Haemolyse nach etwa 4—6 Minuten. Es muß jedoch das obere Scheibchen wie erwähnt außerdem noch diametral auseinandergeschnitten werden, um ein deutliches Bild zu bekommen, da sich das Saponin etwas vom Rande entfernt anreichert (siehe Abb. 5).

Bei 10 γ (bei 20 ccm eine Verdünnung von 1 : 2 Millionen) scheint die Grenze der Nachweisbarkeit zu liegen. Das obere (I) Scheibchen zeigt nach etwa 1—3 Stunden gerade noch erkennbare Haemolyse, das

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

untere (II) ist immer negativ. Es ist allerdings zu betonen, daß das zu diesen Versuchen verwendete Digitonin einen haemolytischen Index von nur 80.000 besaß, während das von KOFLER-FISCHER-NEWESELY 1929 benützte einen H. I. von über 200.000 aufwies. Mit diesem Saponin müßten sich noch günstigere Werte erreichen lassen.

Versuche, durch Tränken von Asbestscheibchen mit verdünnter Digitoninlösung die noch eben haemolytisch wirksame Menge zu bestimmen, ergaben etwa 4—5 γ, es scheint also bei unserer Methode diesen hohen Verdünnungen etwa 50% verloren zu gehen, was nicht verwunderlich ist. Jedenfalls ist es erstaunlich, daß der Nachweis noch bis herunter zu 10 γ gelingt.

Ferner prüften wir auch den Einfluß eines Alkoholzusatzes von 10—15% bei unserem Verfahren und konnten eine etwas raschere Bin-

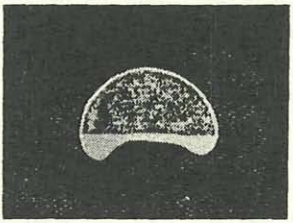


Abb. 5: Saponinnachweis; Erklärung im Text.

dung des Digitonins im oberen Scheibchen (I) nachweisen. Möglicherweise wird durch den Alkohol die Bindungsaffinität des Cholesterins erhöht, sodaß sich in den oberen Schichten eben mehr ablagert. Es scheint aber nicht zweckmäßig zu sein über 20% hinauszugehen, da sich dann eine Verschlechterung der Ergebnisse bemerkbar zu machen beginnt.

Schließlich prüften wir noch einige andere Substanzen, die möglicherweise in den auf Saponin zu analysierenden Flüssigkeiten vorkommen könnten: Zuckerhaltige Extrakte aus Drogen z. B. ein Auszug aus *Gentiana lutea* und auch Rohrzuckerlösungen störten die Reaktion nicht, wenig eine 1%ige Lösung von Quebrachogerbstoff und ein 5%iger wäßriger Auszug aus Radix Ratanhiae. Es erlitt bei letzteren wohl die Größe des Hofes eine gewisse Minderung, sodaß die Empfindlichkeit der Probe auf etwa die Hälfte absinkt. Eine Hinderung der Reaktion (bei 40 γ) trat jedoch nach Zusatz einer 0,5%igen Tanninlösung ein, was merkwürdig erscheint. Trotz vorher eingeleiteter Adsorption des Gerbstoffes an Hautpulver verlief der Versuch auch diesmal negativ. Scheinbar hält das Hautpulver auch Saponin zurück.

Abschließend kann gesagt werden, daß die neue „Asbestscheibchen-Methode" den kapillaranalytischen Nachweis hinsichtlich Schnelligkeit und Empfindlichkeit übertrifft. Erfassungsgrenze 10 γ Digitonin.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zusammenfassung

Im Teil I werden die Ursachen besprochen, die beim mikroskopischen Nachweis kleinster Saponinmengen oder schwach wirksamer Saponine mittels Blutgelatine zu Täuschungen Anlaß geben können. Die als Beispiele angeführten Pflanzen sind in folgende Gruppen eingeteilt:

Pflanzen, die einwandfrei Saponin, wenn auch ein schwachwirksames enthalten, ferner Pflanzen, bei denen Haemolyse vorgetäuscht wird (Pseudohaemolyse), schließlich Pflanzen mit typischer Haemolysewirkung, die jedoch nicht auf ein Saponin zurückzuführen ist. Es werden dann noch die bei der Untersuchung von Organextrakten auftretenden Fehler erörtert.

Im II. Teil wird eine Verbesserung des Kapillaranalytischen Nachweises von Saponin vorgeschlagen, wobei die zu prüfende Saponinlösung durch ein kleines mit Cholesterin getränktes Asbestscheibchen läuft und das Cholesterid mit Benzol an Stelle von Xylol gespalten wird. Die Erfassungsgrenze beträgt 10 γ bei einer Verdünnung von 1 : 2 Millionen.

Literatur

BALANSARD, J., 1934, La ballote fétide: Etude chimique et pharmacodynamique — Comparaison avec quelques Labiées provencales. Lyon.

— 1936, Sur quelques Labiées. Bull. Sc. pharmacol. 43.

BREITWIESER, K., 1942, Pharmakognostische Untersuchungen über Verbenaceen. Schramberg/Schwarzwald (Habil.-Schrift).

BUDISCHOWSKY, H., 1938, Die Saponine in den Labiaten. Dissertation Innsbruck.

CASPARIS, P. und HAAS, K., 1930—1931, Pharmac. Act. Helvet. 5: 62, 6: 181.

FISCHER, R., 1928, Über den mikroskopischen Saponinnachweis durch Blutgelatine. Pharm. Mh. 9/1: 1—5 und 25—27.

— 1930, Über den Saponinnachweis in der Pflanze mit Blutgelatine. S. B. Akad. Wiss. Wien, math. natw. Kl. 139/I: 321—354.

FISCHER, R. und BERTHOLD, L., 1933, Die Beurteilung der Haemolyse in der Blutgelatine beim mikroskopischen Nachweis von Saponinen. Pharm. Presse 38, wiss.-prakt. Heft Oktober 1933: 113—120.

FOERSTERLING, A., 1941, Dissertation, Braunschweig. Hannover.

FREISE, W. F., 1938, Therapeutische Verwendbarkeit von *Carex arenaria*. Pharm. Zentralh. 79/4: 49—51.

FUCHS, L., 1932, Folia (Herba) Plantaginis. Pharm. Presse 37, wiss.-prakt. Heft Nr. 3: 29—33.

FUCKELMANN, J. M., 1911, S. B. u. Abh. naturw. Ges. Rostock, N. F. 3: 267 und 315.

GILG, E. und SCHÜRHOFF, P. N., 1932. Die Bedeutung des Saponinvorkommens innerhalb der *Anemoneae* für die Pflanzensystematik. Arch. Pharm. und Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 270: 217.

GORDONOFF, T. und LÜSCHNER, E., 1935, Über die expektorierende Wirkung einiger Saponine (Quillaja, Saponaria). Z. exp. Med. 97.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

HAAS, K., 1931, Beiträge zur Pharmakochemie von *Equisetum arvense* L. Basel (Diss.).

JARETZKY, R. und LINDNER, W., 1939, Schwierigkeiten beim Saponinnachweis mittels der Blutgelatinemethode und deren Behebung. Arch. Pharm. und Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 277: 45—49.

KOFLER, L., 1927, Die Saponine. Wien.

KOFLER, L. und FISCHER, R., 1936, Bemerkungen zur Arbeit von T. GORDONOFF und E. LÜSCHER. Über die expektorierende Wirkung einiger Saponine (Quillaja, Saponaria). Z. exp. Med. 99 (1): 144.

KOFLER, L., FISCHER, R. und NEWESELY, H., 1929. Über den Nachweis von Saponin in Arzneimitteln und Lebensmitteln. Arch. Pharm. und Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 267: 685—700.

KOFLER, L. und STEIDL, G., 1932. Über das Vorkommen und die Verteilung von Saponinen in pflanzlichen Drogen, I. Blüten. Arch. Pharm. und Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 270: 398—402.

— — 1934. Über das Vorkommen... II. Blätter, Früchte, Rinden, Hölzer, Wurzeln und Rhizome. Arch. Pharm. und Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 272: 300—312.

KROEBER, L., 1922. Studienergebnisse für eine Reihe von Fluidextrakten aus heimischen Arzneipflanzen. Pharm. Zentralhalle Deutschl. 63: 574.

— 1925 a. Studienergebnisse... Pharm. Zentralhalle Deutschl. 66: 338 bis 341.

— 1925 b. Heil- und Gewürzpflanzen. 8.

— 1927 a. Studienergebnisse... Pharm. Zentralhalle Deutschl. 68: 23—25.

— 1927 b. Studienergebnisse... Pharm. Zentralhalle Deutschl. 68: 735 bis 737.

— 1933 ... Hippokrates, 4: 337.

— 1934—1935. Das neuzeitliche Kräuterbuch. Stuttgart-Leipzig.

KUHN, A. und SCHÄFER, G., 1935. Zur Kenntnis homöopathischer Zubereitungen. Pharm. Ztg. 80: 257—260.

LINDNER, W., 1943. Gräsersaponine. Untersuchungen über ihr Vorkommen. Pharm. Industrie, 10: 181—186.

LUFT, G., 1926. Der Nachweis von Saponin in der Pflanze. S. B. Akad. Wiss. Wien, math.-natw. Kl. 135 I: 259.

OBERGFELL, H. E., 1926. Ranunculaceen-Saponine. Frankfurt a. M. (Diss.)

PATER, B., 1925. Über einen Anbauversuch mit dem Spitzwegerich. Pharm. Mh. 6/1: 2—3.

ROBERG, M., 1937 a. Über das Vorkommen und die Verteilung von Saponinen in Kräuterdrogen, I. Arch. Pharm. und Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 275: 84—103.

— 1937 b. Über das Vorkommen... II. Arch. Pharm. ... 275: 145—166.

SOLACOLU, T. und WELLES, E. 1933. Beiträge zur Verbreitung von Saponinen im Pflanzenreich. Arch. Pharm. und Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 271: 470—477.

WASICKY, R., 1932. Physiopharmakognosie. Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: 2_1-3

Autor(en)/Author(s): Fischer Robert, Wybiral Maria

Artikel/Article: Zum Nachweis kleinster Saponinmengen. 77-91