

9. Die kolorimetrische Bestimmung der Sennaglycoside

von W. Kussmaul und B. Becker.

(29. X. 46.)

Die Farbreaktion nach *Bornträger* zum Nachweis von Oxyanthrachinonen hat bei den Untersuchungen von Drogen der Anthrachinonreihe wie Aloe, Frangula, Cascara und Senna stets eine wichtige Rolle gespielt. Insbesondere bei der Sennadroge, aus der krystallisierte Glycoside erst in jüngster Zeit dargestellt worden sind, mussten Inhaltsbestimmungen der Droge selbst, wie von daraus isolierten Wirkstoffen fast ausschliesslich auf kolorimetrischem Wege durchgeführt werden¹).

Bekanntlich besteht die *Bornträger*'sche Reaktion darin, dass Oxyanthrachinone beim Versetzen mit Alkali eine — nach Anzahl und Stellung der Oxygruppen und weiterer Substituenten verschiedene — Rotfärbung erzeugen.

Bei Folia Sennae liessen sich in quantitativer Richtung erst dann Schlüsse aus der *Bornträger*-Reaktion ziehen, als erkannt worden war²), dass die hauptsächlichsten Wirksubstanzen nicht als Anthrachinonglycoside, sondern in einer reduzierten Form in der Droge vorliegen und dass somit neben der Glycosidspaltung auch noch eine Oxydation zur Anthrachinonstufe stattfinden muss, bevor irgendwelche quantitative Aussagen gemacht werden dürfen.

Alle früheren, auf Grund kolorimetrischer Messungen gemachten Angaben³) über den Gehalt an wirksamen Glycosiden der Senna sind somit einer Revision zu unterziehen. Aber auch in neueren Arbeiten über dieses Thema wird der Oxydationsgrad der zu untersuchenden Substanz nicht berücksichtigt, und die Oxydation zur Anthrachinonstufe bleibt der zufälligen Einwirkung des Luftsauerstoffes überlassen⁴).

Die Farbbeständigkeit der nach *Bornträger* erzeugten alkalischen Farblösung aus Senna soll grösser sein als die der entsprechend hergestellten Farblösungen aus Aloe usw. Dieser Umstand wird zum Nachweis von Senna in Drogengemischen benützt⁵). Und doch liegt

¹) Vgl. A. Tschirch, Hdb. d. Pharmakognosie II, 1364ff. (1917).

²) W. Straub und H. Gebhardt, Arch. exp. Path. Pharm. **181**, 399 (1936).

³) z. B. A. Tschirch, Schw. Wschr. Chem. Pharm. **42**, 456 (1904), und E. Maurin, Bull. sci. pharmacol. **28**, 373 (1921); **29**, 617 (1922).

⁴) J. W. Fairbairn, Pharm. J. **148**, 198 (1942), M.-M. Janot und A. Morel, Ann. pharm. franç. **2**, 7 (1944).

⁵) G. Chessa, Chim. Ind., Agric., Biol., Realizzaz. corp. **16**, 578 (1940) (C. **1941**, II, 372).

gerade in der nur relativen Beständigkeit des roten Farbtones, zusammen mit der Abhängigkeit von der Art und der Menge des verwendeten Oxydationsmittels eine wesentliche Schwierigkeit der quantitativen Auswertung, auf die wir noch zurückkommen werden.

Die Isolierung und Reindarstellung der hauptsächlichsten Wirksubstanzen der Sennadroge durch *Stoll* und Mitarbeiter¹⁾ schuf nun die Voraussetzung zur Ausarbeitung einer quantitativen kolorimetrischen Messmethode. Frühere Untersucher (z. B. *Straub* und *Gebhardt*, loc. cit.) verglichen ihre Farblösungen meistens mit eingestellten Lösungen von Aloe-Emodin, da sie annahmen, dass das oxydierte Aglucon aus Senna identisch mit Aloe-Emodin sei. Die von *Stoll* hergestellten krystallisierten Sennagluconide, die Sennoside A und B, ebenso die *Straub*'schen Produkte, leiten sich jedoch keineswegs von Aloe-Emodin, d. i. 1,8-Dioxy-3-oxymethyl-anthrachinon, sondern vom Rhein, d. i. 1,8-Dioxy-anthrachinon-3-carbonsäure, ab. Schüttelt man z. B. eine ätherische Lösung von Aglucon aus Sennosid mit n. Natriumhydrogencarbonat, so wird die gesamte farbgebende Substanz dem Äther entzogen, während aus einer ätherischen Lösung von Aloe-Emodin mit Hydrogencarbonat nichts entzogen wird.

Der aus den Sennosid-Agluconen durch Oxydation in alkalischer Lösung erzeugte Farbstoff ist aber auch nicht identisch mit Rhein. Schon ein einfacher visueller Vergleich zeigt, dass die roten Oxydationslösungen der Senna-Aglucone einen wesentlich kräftigeren Blautsch aufweisen als die entsprechende Farblösung des Rheins. Der Farbton einer Aloe-Emodinlösung dagegen ist von demjenigen des Rheins nicht zu unterscheiden.

Der Verlauf der „typischen Farbkurven“, aufgenommen mit dem *Zeiss-Pulfrich*-Photometer, bestätigt eindeutig den visuellen Befund: Rhein und Emodin absorbieren maximal im Bereich grünen Lichtes (Filterschwerpunkt S50), während der Scheitel der Absorptionskurve bei den Senna-Agluconen im Gelbgrünen (Filterschwerpunkt S53) liegt. (Siehe Figur 1.)

Es ist bisher nicht gelungen, den bei der Farbreaktion erzeugten Farbstoff in krystallisierter Form zu fassen, doch ist dies für die quantitative Messung nebensächlich, da wir zur Eichung des Kolorimeters von gewogenen Mengen der wohlkrystallisierten Glucoside ausgehen, deren gravimetrisch ermittelter Aglucongehalt 62,5% beträgt.

Die Senna-Aglucone gehen mit leuchtend gelber Farbe in Alkali und geben, wie bereits erwähnt, erst nach Oxydation die bekannte Rotfärbung. Diese Oxydation kann auf verschiedenen Wegen herbeigeführt werden, z. B. durch Belichten mit der Quarzlampe, durch Schütteln der erwärmten Lösung mit Sauerstoff oder Luft, durch Zu-

¹⁾ *A. Stoll, W. Kussmaul* und *B. Becker*, Verh. Schw. Natf. Ges. **1941**, 235.

satz von Hydrogenperoxyd usw. Die erzielte Farbstärke wie die Farbnuance wechseln nach Art und Menge des angewandten Oxydationsmittels. Beim Schütteln der erhitzten alkalischen Lösung mit Luft z. B. entsteht eine sehr tief violettrote Farbe mit schwärzlichem Schimmer, deren Stärke aber recht variabel ist und die relativ rasch ausbleicht. Sie eignet sich deshalb nicht zu kolorimetrischen Messungen.

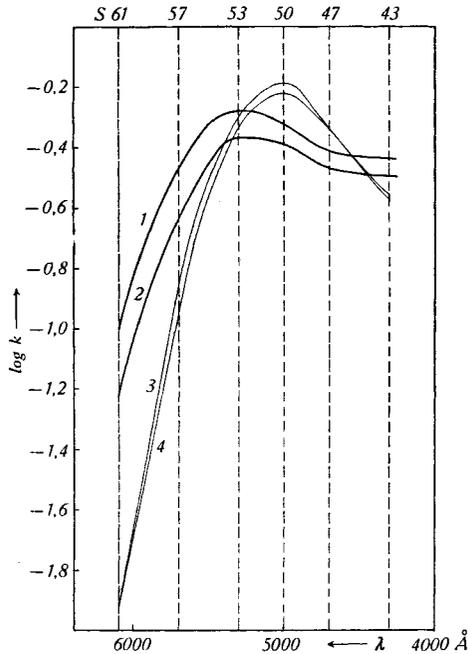


Fig. 1.

Je 0,2 mg Substanz in 10 cm³ 1-n. Natronlauge, mit 0,2 cm³ 3-proz. H₂O₂ erhitzt. Schichtdicke 1 cm. Kurve 1: Aglucon A, Kurve 2: Aglucon B, Kurve 3: Rhein, Kurve 4: Aloe-Emodin.

Durch Verwendung von 3-proz. Hydrogenperoxyd als Oxydationsmittel gelangten wir zu einem bequem standardisierbaren Oxydationsverfahren, das einen leuchtend weinroten Farbton von reproduzierbarer Stärke liefert, der während dreissig Minuten nur unmerklich abnimmt und erst im Verlauf mehrerer Stunden stärker ausbleicht.

Zur Messung der Farbstärke benützen wir das *Zeiss-Pulfrich*-Photometer oder besser das lichtelektrische Kolorimeter nach *R. Havemann*¹⁾, bei dem durch die Ausschaltung jedes subjektiven Einflusses ein Ablesefehler praktisch wegfällt.

¹⁾ *R. Havemann*, *Bioch. Z.* **301**, 105 (1939). Der Apparat wurde von *W. Kauhausen*, Berlin, hergestellt und als „Weka“-Kolorimeter bezeichnet.

Das hier beschriebene absolutkolorimetrische Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an wirksamen Glucosiden der Senna ist in bezug auf Zuverlässigkeit und Anwendungsbreite jeder uns bis jetzt bekannten Methode überlegen. Es lässt sich auf rohe Extrakte, auf angereicherte Niederschläge wie auf Glucosidkrystallisate in Substanz oder in präparierter Form (z. B. Dragées) anwenden.

Methodik.

a) Herstellung der ätherischen Agluconlösung:

Die zu prüfende Substanz wird zunächst in Wasser in Lösung gebracht, was bei der Säurenatur der Sennoside durch Zugabe von einigen Tropfen Alkali leicht erfolgt. Damit die Farbwerte in den günstigsten Messbereich des Kolorimeters fallen, empfiehlt sich die Herstellung einer Lösung mit 0,5–1,0%₀₀ Glucosidgehalt.

Zur Spaltung des Glucosids in Aglucon + Zucker werden 10 cm³ der vorstehenden Lösung mit 5 cm³ konz. Salzsäure auf dem Dampfbad erhitzt. Schon nach wenigen Minuten beginnt eine flockige Abscheidung des Aglucons, die nach 15 Minuten beendet ist.

Die auf Zimmertemperatur gebrachte Suspension wird durch vorsichtigen Zusatz von konz. Natronlauge unter Kühlung gerade gelöst, die klare gelbbraune Lösung im Scheidetrichter mit 80 cm³ Äther überschiebt, mit 50-proz. Schwefelsäure angesäuert und sofort kräftig durchgeschüttelt. Die gelbe Ätherlösung wird abgetrennt und der Wasserteil, zusammen mit einer eventuell sich bildenden Zwischenschicht, erneut mit etwas konz. Natronlauge in Lösung gebracht. Die alkalische Lösung wird nun mit 40 cm³ Äther überschiebt, wieder mit Schwefelsäure angesäuert und ausgeäthert. Diese Operation wird in gleicher Weise mit 40 cm³ Äther wiederholt. Das wiederholte Auflösen in Alkali ist notwendig, um ein Einschliessen des Aglucons in der flockigen Zwischenschicht zu vermeiden.

Die vereinigten Ätherfraktionen werden drei- bis viermal mit je 5 cm³ n. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die vereinigten Hydrogencarbonatlösungen überschiebt man mit 60 cm³ Äther, säuert mit 50-proz. Schwefelsäure an und schüttelt, nachdem die stürmische Kohlendioxydentwicklung etwas nachgelassen hat, energisch durch. Die Extraktion wird noch zweimal mit je 20 cm³ Äther wiederholt. Falls sich auch hier eine Zwischenschicht bilden sollte, wird diese durch Zugabe von Alkali in Lösung gebracht und die klare alkalische Lösung unmittelbar vor dem Ausschütteln mit Äther angesäuert. Die vereinigten Ätherextrakte werden durch ein Faltenfilter filtriert und im Messkolben auf 100 cm³ aufgefüllt.

Die so erhaltenen gelben Agluconlösungen sind nicht beliebig haltbar und sollen innert 10 Stunden weiter verarbeitet werden.

b) Ausführung der Farbreaktion:

5 cm³ der vorstehend beschriebenen Ätherlösung werden im Schütteltrichter mit 10 cm³ n. Natronlauge extrahiert. Die blass gelbbraune alkalische Lösung versetzt man mit 0,2 cm³ einer 3-proz. Hydrogenperoxydlösung und erhitzt anschliessend in einem weiten Reagenzglas während vier Minuten auf einem kräftig siedenden Dampfbad.

Die jetzt weinrote Lösung wird während einer Minute am laufenden Wasser gekühlt und darauf die Farbstärke innert 10 Minuten kolorimetrisch bestimmt.

Als Kolorimeter verwenden wir das *Zeiss-Pulfrich*-Photometer mit normaler Photometerlampe und dem Filter S53 (gelbgrün), oder das lichtelektrische „Weka“-Kolorimeter nach *Havemann* unter Verwendung einer Quecksilberlampe mit der aus der Anleitung ersichtlichen Filterkombination für die gelbgrüne Hg-Linie 5460,7 Å.

Die der Farbstärke entsprechende Agluconmenge wird einer Eichkurve entnommen, die den Mittelwert der Eichkurven von reinem Sennosid A und reinem Sennosid B darstellt.

c) Herstellung der Eichkurve:

30 mg reinstes, im Hochvakuum bei 80° getrocknetes Sennosid B, entsprechend 18,75 mg Aglucon, werden in einem 50 cm³-Messkolben unter Zugabe von einigen Tropfen Alkali in Lösung gebracht. Je 10 cm³ dieser Stammlösung werden mit Salzsäure gespalten und aufgearbeitet wie sub a) beschrieben.

5 cm³ der ätherischen Agluconlösung werden gemäss b) in 10 cm³ Natronlauge oxydiert.

Die Messung im *Zeiss-Pulfrich*-Photometer mit der 1 cm-Küvette liefert einen Extinktionskoeffizienten $k = 0,42$. Diesen Wert trägt man in einem Koordinatensystem auf der Ordinate, den dazugehörigen Agluconwert von 0,1875 mg in einem geeigneten Masstab auf der Abszisse auf. Durch Variation der Schichtdicke oder Variation der Äthermenge werden beliebige weitere Punkte im Koordinatensystem erhalten, die alle auf einer Geraden durch den Nullpunkt liegen. Diese Gerade bildet die Eichkurve für Sennosid B.

Die Eichung mit Sennosid A erfolgt auf genau gleiche Weise. Die erhaltene Gerade liegt etwas steiler, d. h. Aglucon A ist etwas farbkräftiger.

Die Messung im „Weka“-Kolorimeter geschieht entsprechend. Als Messgefäss dient eine Makroküvette von 0,5 cm Schichtdicke. Die abgelesenen Trommelwerte können direkt auf der Ordinate eingetragen werden, auf der Abszisse die dazugehörigen Agluconmengen. Die erhaltenen Kurven von Aglucon A und Aglucon B sind einander sehr ähnlich, wobei die A-Kurve wiederum etwas steiler liegt.

Bei Verwendung des „Weka“-Kolorimeters beträgt die Fehlergrenze der Bestimmung einer gegebenen ätherischen Agluconlösung weniger als 1%. Beim *Zeiss-Pulfrich*-Photometer können subjektive Fehler gelegentlich eine Rolle spielen und zu „persönlichen“ Eichkurven führen.

Grössere Fehler können nur bei der Herstellung der ätherischen Agluconlösung auftreten, falls die Ausschüttelungen nicht sorgfältig gemäss Vorschrift durchgeführt werden.

Anwendungsbeispiel: Gesamtextrakt von *Folia Sennae*.

10 g pulverisierte *Folia Sennae* werden mit Wasser oder wässrigem Methanol erschöpfend extrahiert und die Extraktlösung nötigenfalls durch Einengen im Vakuum von Methanol befreit. Die rückständige wässrige Lösung wird mit Salzsäure schwach kongosauer gestellt und wiederholt ausgeäthert.

Diese Ätherlösung enthält alle freien Anthrachinone, wie Rhein und Emodin. Ihr Anteil ist gegenüber den an Zucker gebundenen reduzierten Anthrakörpern verschwindend gering; so beträgt der Gehalt einer Droge guter Qualität an freiem, hydrogencarbonatlöslichem Rhein nicht mehr als 1 Promille.

Die ausgeätherte Wasserlösung wird auf 500 cm³ aufgefüllt. Je 10 cm³ werden gemäss a) mit Salzsäure verkocht und der Reaktionslösung die Aglucone mit Äther entzogen. Bei der Behandlung der ätherischen Agluconlösung mit Hydrogencarbonat gehen über 90% der Aglucone in die Hydrogencarbonat-Lösung und werden gemäss a) und b) aufgearbeitet und gemessen.

Chemisch-pharmazeutisches Laboratorium
„Sandoz“ (Prof. Dr. A. Stoll), Basel.