

Kolorimetrische Bestimmung der Glycyrrhizinsäure als Aglukon

VON DER
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG
DER WÜRDE EINES DOKTORS DER
NATURWISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE
PROMOTIONSARBEIT
VORGELEGT VON

FRANZ WIEST

dipl. Apotheker von Oberägeri (Zug)

Referent: Herr Prof. Dr. J. Büchi Korreferent: Herr Prof. Dr. K. Münzel

Zug 1949
Buchdruckerei W. Zürchers Erben

Leer - Vide - Empty

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im pharmazeutischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ausgeführt. Es sei mir gestattet, an dieser Stelle

Herrn Professor Dr. Jakob Büchi

der dazu die Anregung gab und den Verlauf der Arbeit überwachte, für sein stetes Interesse und seine wertvollen Ratschläge den herzlichsten Dank auszusprechen.

INHALTSÜBERSICHT

A. EINLEITUNG	7
B. ALLGEMEINER TEIL	9
I. Ausgangsmaterial: Das Süßholz	9
a) Definition	9
b) Offizinelle Süßholzdrogen der einzelnen Pharmakopöen	11
c) Weitere glycyrrhizin-ähnliche Substanzen führende Pflanzen	11
d) Inhaltsstoffe von Radix Liquiritiae	13
e) Glycyrrhizin, ein Saponin	16
1) Chemische Eigenschaften der Glycyrrhizinsäure	18
2) Physikalische Eigenschaften der Glycyrrhizinsäure	23
3) Physiologische Eigenschaften der Glycyrrhizinsäure	26
f) Anwendung	28
II. Pharmazeutische Zubereitungen	30
1) Succus Liquiritiae	31
2) Extractum Liquiritiae	33
3) Succus Liquiritiae solutus	33
4) Elixir e Succo Liquiritiae	33
5) Elixir Glycyrrhizae	35
6) Extractum Liquiritiae	35
7) Sirupus Liquiritiae	36
8) Glycyrrhizinum ammoniacale	36
9) Pasta Liquiritiae	37
10) Pulvis Liquiritiae compositus	38
C. SPEZIELLER TEIL	39
I. Arbeitsplan: Beabsichtigte Untersuchungen	39
II. Isolierung, Identifizierung und Reinigung des Glycyrrhizins in Form des primären Ammoniumsalzes	40
1) Charakteristik des Drogen-Ausgangsmaterials	40
a) Untersuchungsverfahren	40
b) Prüfungsergebnisse	43
2) Studium der Extraktionsmöglichkeiten der Droge anhand der Darstellung von Glycyrrhizinum ammoniacale	44
a) Vorschriften der Arzneibücher u. einschlägige Literaturarbeiten	44
b) Eigene Vorschläge z. Darstellung von Glycyrrhizinum ammoniacale	45
c) Darstellung von 3 verschiedenen Sorten Glycyrrhizinum ammoniacale	46
d) Qualitative und quantitative Prüfung der verschiedenen Sorten	50
aa) Definition	50
bb) Untersuchungsverfahren	50
cc) Prüfungsergebnisse	52
dd) Beurteilung der Prüfungsergebnisse	55
3) Herstellung von reinem, primärem Ammoniumglycyrrhizinat	56
a) Allgemeines	56
b) Prakt. Teil: Darstellung von primärem Ammoniumglycyrrhizinat	60
III. Bestimmung der Glycyrrhizinsäure	61
1) Die hauptsächlichsten in der Literatur beschriebenen Bestimmungsverfahren	61
a) Allgemeines	61

b) Gruppe: I: Ermittlung des Glycyrrhizinsäuregehaltes durch Bestimmung derselben als Glykosid	62
c) Bemerkungen zu den einzelnen Verfahren	62
d) Gruppe: II: Ermittlung des Glycyrrhizinsäuregehaltes durch Bestimmung der Hydrolyse-Spaltprodukte, speziell des Zuckerteils	64
e) Bemerkungen zu den einzelnen Verfahren	64
2) Eigene Versuche zu einer brauchbaren Bestimmungsmethode für Glycyrrhizinsäure in Radix Liquiritiae zu gelangen	66
a) Gruppe: III: Ermittlung des Glycyrrhizinsäuregehaltes durch Bestimmung des Aglukons	69
b) Bemerkungen zu den einzelnen Verfahren	69
c) Untersuchung der Farbreaktion des Glycyrrhizins mit Vanillin und konzentrierter Schwefelsäure	71
d) Prinzip der Bestimmungsmethode	75
e) Prüfung der Reaktionsbedingungen für den Blindversuch	75
f) Bestimmungsversuche mit reinen Salzen der Glycyrrhizinsäure	78
g) Versuche mit reinem α -Glycyrrhetinsäure-Methylester	85
h) Aufsuchung der geeigneten Hydrolysebedingungen mit Reinsubstanz	86
i) Vorschlag einer Glycyrrhizinsäure-Bestimmungsmethode des Süßholzes	87
k) Kritik des Bestimmungsvorschlages	88
l) Versuche mit Glycyrrhizinum ammoniacale	90
3) Vorschrift zur Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Radix-Liquiritiae und Glycyrrhizinum ammoniacale	90
a) Praktische Ergebnisse der Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen	92
b) Beurteilung der Resultate	95
4) Vorschlag für eine vereinfachte Glycyrrhizinsäure-Bestimmung auf gravimetrischem Wege	95
a) Resultate d. Glycyrrhizinsäure-Bestimmung auf gravimetrischem Wege und Vergleich mit den kolorimetrisch ermittelten Werten	97
b) Beurteilung der beiden Bestimmungsmethoden und Ablehnung derselben für Radix Liquiritiae	97
5) Endgültig bereinigte und vorgeschlagene Vorschrift zur Glycyrrhizinsäure-Bestimmung für Radix Liquiritiae	101
a) auf gravimetrischem Wege	101
b) auf kolorimetrischem Wege	102
6) Praktische Ergebnisse der Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen	103
IV. Aufsuchung des Fluorescenz-erzeugenden Stoffes der Süßholzwurzel	103
1) Einleitung	103
2) Theoretischer Teil	104
A) Allgemeines	104
B) Selektionierung der für die Fluorescenz in Frage kommenden Süßholz-Bestandteile	106
3) Praktischer Teil	109
A) Herstellung der Reinsubstanzen	109
B) Prüfung der dargestellten Präparate	111
a) Prüfungsvorschriften	111
b) Prüfungsergebnisse	112
C) Beurteilung der Resultate	113
D) Prüfung des mit Liquiritin angereicherten Rückstandes auf Gerbstoffe	113
Zusammenfassung	115

A. EINLEITUNG

Von jeher wurden die mannigfaltigsten Arzneizubereitungen der Süßholzwurzel zum äußerlichen und innerlichen Gebrauch verwendet. Dabei glaubte man die Hauptwirkung der Glycyrrhizinsäure zuschreiben zu müssen. In neuerer Zeit ist man geneigt, etwelche Wirkung auch dem in der Wurzel vorhandenen Flavanon-Glukosid Liquiritin zuzusprechen. Es ist daher verständlich, daß zur Beurteilung der Drogen-Qualität resp. der daraus hergestellten Präparate in erster Linie eine Gehaltsbestimmung der Glycyrrhizinsäure angestrebt wurde.

Die Durchsicht der einschlägigen Literatur bis in die neuere Zeit bewies die große Unzulänglichkeit der vielen Bestimmungsverfahren für die Glycyrrhizinsäure.

Nachstehende Untersuchungen hatten anfänglich die Herstellung verschiedener Süßholz-Präparate zum Gegenstand. In der Folge zeigte es sich aber, daß die Prüfung ein und desselben Präparates nach verschiedenen Bestimmungsmethoden stets nicht miteinander übereinstimmende Glycyrrhizinsäurewerte ergab und daß selbst bei ein und derselben Methode bei der gleichen Droge große Streuungen in den Glycyrrhizinsäuregehalten auftraten. Diese Tatsache veranlaßte uns, die ursprüngliche Problemstellung wie folgt abzuändern:

Anhand des Präparates Glycyrrhizinum ammoniacale wurden die Extraktionsmöglichkeiten der Droge studiert; ferner wurde aus dieser Süßholzzubereitung analysenreines, primäres Ammoniumglycyrrhizinat hergestellt, welches einerseits zur Ueberprüfung der Bestimmungsmöglichkeiten für Glycyrrhizinsäure, andererseits zur Aufsuchung des Fluorescenz-erzeugenden Stoffes in der Süßholzwurzel diente.

Leer - Vide - Empty

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Ausgangsmaterial: Das Süßholz

a) Definition

Unter dem Namen Süßholz faßt man die süßschmeckenden Wurzeln und Ausläufer von verschiedenen Vertretern des Genus *Glycyrrhiza* L. zusammen. Die systematische Bearbeitung dieser Gattung ist bis anhin unvollständig geblieben. Auf Grund der Arbeiten von Boissier¹ und derjenigen von Regel & Herder² läßt sich die Gattung *Glycyrrhiza* wie folgt ein- und unterteilen:

Zugleich vermittelt die tabellarische Zusammenstellung einen Ueberblick über das Vorkommen und die charakteristischen Merkmale der einzelnen Süßholzlieferanten.

¹ Boissier: *Flora Oriental.* II, 202 (1872).

² Regel & Herder: *Enumeratio Plantar. in regionibus eis-et transiliensibus etc.* Bull. Soc. Imp. des naturalistes de Moscou 2, 572 (1866).

Tabelle 1

Ein- und Unterteilung der Gattung *Glycyrrhiza*

Art Nomina	Varietät	Synonyma	Vorkommen wild in Kultur	Charakteristika Stengel	Blatt	Frucht	Blüte	liefern das ... Stichholz
1. <i>Glycyrrhiza</i> <i>glabra</i> = <i>Liquiritia</i> <i>officinalis</i> Moench	<i>typica</i> Regel et Herder		Süd- und Kleinasien Norper- sien	Sesquialien Spanien Frankreich England	fast kahl	kahl meist 4samig	blau bis blau- violett	spanische französische italienische
<i>violacea</i> Boissier			Euphrat- länder, Mesopota- mien				violett	mesopota- mische teilweise syrische
			Syrien					
	<i>glanduli- fera</i> , Regel et Herder	<i>Glycyrrhiza</i> <i>glandulifera</i> und <i>Süd- hirsuta</i>	Galilien Zentral- und Süd- rußland	Wolgadelta um Batum Deutsch- land	drüsig behaart	drüsig behaart	blau- violett	russische
		<i>Glycyrrhiza</i> <i>brachycarpa</i>	Syrien Persien westliches China	bei Barnberg Schwein- furt				
	<i>pallida</i> Boissier		Mesopota- mien					rötlich weiß mische
2. <i>Glycyrrhiza</i> <i>uralensis</i> Fisch		<i>Glycyrrhiza</i> <i>glandulifera</i> Waldst. et Kit var. <i>grandiflora</i> <i>Glycyrrhiza</i> <i>asperina</i>	Ural bis Mandschu- rei					mongolische mandschurische
3. <i>Glycyrrhiza</i> <i>pallidiflora</i> Maxim			Amur- gebiet					mandschurische

b) Offizinelle Süßholzdrogen der einzelnen Pharmakopöen

In sämtlichen unten angeführten Pharmakopöen kommt ausschließlich die Gattung *Glycyrrhiza* als Süßholzlieferant zur Anwendung. *Radix Liquiritiae* wird teils geschält, teils ungeschält gefordert; mitunter verlangen die Pharmakopöen sowohl die geschälte wie auch die ungeschälte Droge, wie aus folgender Uebersicht zu ersehen ist:

Tabelle 2

Pharmakopöen	Stammpflanze	liefert	Droge
U. S. P. XIII	<i>Glyc. glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i> <i>Glyc. glabra</i> L. var. <i>typica</i> u. andere Varietäten		geschält ungeschält
Ph. Dan. VIII	<i>Glyc. glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i>		geschält
D. A. B. 6	<i>Glyc. glabra</i> L. verschiedene Varietäten		geschält
Brit. Ph. 1932	<i>Glyc. glabra</i> L. verschiedene Varietäten		geschält ungeschält
Codex Gall. 6	<i>Glyc. glabra</i> L. verschiedene Varietäten		geschält ungeschält
F. Ital. VI	<i>Glyc. glabra</i> L.		ungeschält
Ph. Austriaca VIII	<i>Glyc. glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i> <i>Glyc. glabra</i> L.		geschält ungeschält
Svenska F. 1925	<i>Glyc. glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i>		geschält
Ph. Helv. V	<i>Glyc. glabra</i> L.		geschält
Ph. Hung. IV	<i>Glyc. glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i> <i>Glyc. glabra</i> L.		geschält ungeschält

Bisweilen wird mit Hartnäckigkeit an der unberechtigten Auffassung festgehalten, daß das geschälte Süßholz nur russischer und das ungeschälte nur spanischer Herkunft sein dürfe. Heutzutage liefern ziemlich alle produzierenden Länder sowohl geschälte wie ungeschälte Droge. Des weitern lassen einige Arzneibücher für die Humanmedizin nur die geschälte Süßholzwurzel zu, während sie für die Veterinärmedizin die ungeschälte Droge vorschreiben.

c) Weitere glycyrrhizin-ähnliche Substanzen führende Pflanzen

Der Vollständigkeit halber seien hier sämtliche zur Zeit bekannten glycyrrhizin-ähnliche Substanzen enthaltenden

Pflanzen nach Angaben von Tschirch³ Wehmer⁴ und Klein⁵ zusammengestellt.

Tabelle 3

Pflanze	Glycyrrhizin-führender Teil	Bemerkungen
Leguminosen-Papilionatae		
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Wurzel	
<i>Glycyrrhiza lepidota</i>	Wurzel	
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Wurzel	
<i>Glycyrrhiza glandulifera</i>	Wurzel	
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Wurzel	
<i>Glycyrrhiza asperrima</i>	Wurzel	
<i>Abrus precatorius</i>	Stengel, Blätter, Wurzeln	Indisches Süßholz
<i>Periandra dulcis</i>	Wurzel	Brasilian. Süßholz
<i>Periandra mediteranea</i>	Wurzel	
<i>Ononis spinosa</i>	Wurzel	Ononiglycyrrhizin, Umwandlungsprodukt von vielleicht vorhande- nem Glycyrrhizin.
<i>Astragalus glycyphyllos</i>	Wurzel	Glycyrrhizingehalt frag- lich
<i>Astragalus sarcocolla</i>	Wurzel	Enthält Sarcocollin = Glycyrrhizin?
<i>Arachis hypogaea</i>	ganze Pflanze	
Leguminosen-Caesalpinoideae		
<i>Gleditschia triacanthos</i>	Samen	Enthält glycyrrhizinähn- liche Substanz
Juglandaceae		
<i>Juglans regia</i>	Wurzel	
Menispermaceae		
<i>Tinospora Rumphii</i>		Enthält glycyrrhizinähn- liche Substanz
Penaeaceae		
<i>Penaea sarcocolla</i>		Enthält Sarcocollin
<i>Penaea mucronata</i>		Enthält Sarcocollin
<i>Penaea squamosa</i>		Enthält Sarcocollin
Umbelliferae		
<i>Chaerophyllum odoratum</i>	Kraut	
<i>Myrrhis odoratum</i>	Frucht	
Polypodiaceae		
<i>Polypodium vulgare</i>	Wurzel	
<i>Polypodium pinnatifidum</i>	Wurzel	
Sapotaceae		
<i>Lucuma glycyphylla</i>	Rinde	Glycyrrhizinsäure- Dihydrat
<i>Achras sapota</i>		
<i>Sideroxylon Richardii</i>	Rinde	Rinde, bis 30 % Glycyrrhizin

³ Tschirch: Handbuch d. Pharmakognosie: Bd. II 91 (1912) Tauchnitz, Leipzig.

⁴ Wehmer: Die Pflanzenstoffe: Bd. I 540 (1929) Fischer, Jena.

⁵ Klein: Handbuch d. Pflanzenanalyse: Bd. III/2 1130 (1932) Springer Wien.

Der Süßstoff von *Eupatorium Rebaudianum*, das Eupatorin, wahrscheinlich $C_{42}H_{72}O_{21}$, ist nicht mit Glycyrrhizin identisch.

d) Inhaltsstoffe von *Radix Liquiritiae*

I. Glykoside beziehungsweise Glukuronide:

Auf diese Wirkstoffe wird in einem späteren Kapitel näher eingegangen werden. Sie seien hier nur namen- und mengenmäßig aufgeführt.

1) Glycyrrhizin, (= Glycyrrhizinsäure)
 $C_{42}H_{62}O_{16}$

Mengenmäßiges Vorkommen in der Wurzel nach:

Tschirch, Cederberg, Eriksson ⁶	5,3 — 7	%
Flückiger, Sestini, Möller u. a. ⁶	6,27 — 8	%
Gawalowski ⁶	9	%
Wehmer ⁶	5,9 — 7,3	%

2) Neutrales Saponin: Dieses besitzt nach Kobert⁷ keinen süßen Geschmack und enthält als Zuckerkomponente nicht Glukuronsäure. Es tritt im Auszug der entrindeten Droge nach Entfernen des Glycyrrhizins auf. Bis jetzt gelang es jedoch nicht, dieses rein herzustellen und zu analysieren. Das aus ihm hergestellte Sapogenin wirkt als Natriumsalz in noch 3750facher Verdünnung hämolytisch auf Menschenblutkörperchen.

3) Aetherunlösliches Harz: Dieser in der Rinde der Süßholzwurzel lokalisierte glykosidische Körper verhält sich analog dem Glycyrrhizin, schmeckt jedoch nicht süß. Bei der hydrolytischen Spaltung zerfällt er nach Kobert⁷ in Glukuronsäure (nur durch Farbreaktionen nachgewiesen) und ein Sapogenin, welches in alkalischer Kochsalzlösung stark hämolytisch wirkt.

Eine teilweise Bestätigung haben diese Ergebnisse durch Houseman⁸ erfahren. Dieser Autor bezweifelt freilich, daß im Aether löslichen Harze die Glycyrrhetinsäure es sei, welche die Hämolyse hervorrufe, da sie ja in Aether unlöslich ist. Vielmehr vermutet er in der Süßholzwurzel das Vorkommen von freiem Sapogenin neben aktivem Saponin.

⁶ Tschirch: Handbuch der Pharmakognosie 2. Aufl. 167 (1937).

⁷ Kobert: Ber. d. pharm. Ges. XXV 169 (1915).

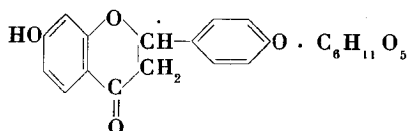
⁸ Houseman: Amer. Journ. Pharm. 84 531 (1912) und 88 97 (1916).

4) **Liquiritin**, ein Flavanonglukosid, von der Zusammensetzung $C_{21}H_{22}O_9 \cdot H_2O$, wurde aus der Wurzel von *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera*, Regel et Herder, zuerst von Fujita & Tsuda⁹ isoliert. Eingehender haben sich damit Shinoda & Ueeda¹⁰ befaßt. Diesen beiden Forschern gelang es, aus dem methylalkoholischen Wurzelauszug nach Eindampfen und Umkristallisieren aus heißem Wasser und verdünntem Alkohol das Glukosid in Form farbloser Kristalle vom Schmelzpunkt 212° zu erhalten. Durch Hydrolyse ließ es sich nach der Gleichung $C_{21}H_{22}O_9 + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_{15}H_{12}O_4$ aufspalten in Glukose und ein Aglukon (Liquiritigenin) vom Schmelzpunkt 207° .

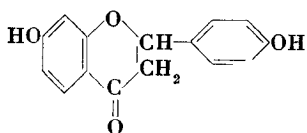
In alkoholischer Lösung geben sowohl das Aglukon, wie auch das Glukosid, mit Eisenchlorid keine Färbung. Durch Salzsäure und Magnesium wird die Flüssigkeit jedoch violettrot gefärbt.

Auf Grund ihrer Untersuchungen schlugen Shinoda & Ueeda¹¹ für das Glukosid (I) und das Aglukon (II) folgende Konstitutionsformeln vor:

I. **Liquiritin**: ein 7-Oxy-4'-glucosidoxy-flavanon



II. **Liquiritigenin**: 4',7-Dioxy-flavanon



II. Mannit:

Dieses Hexit wurde im Wurzelauszug durch Tschirch & Relander¹² aufgefunden. Tschirch bezweifelt zwar, daß Mannit primär in der Droge vorkommt. Es wäre denkbar, daß er sich durch Reduktion von Mannose beziehungsweise Mannuronsäure, welche Bergmann¹³ als Zuckerteil des

⁹ Fujita & Tsuda: Vortrag in der Hauptsitzung d. Pharmazeut. Vereins im April 1931.

¹⁰ Shinoda & Ueeda: Ber. dtsch. chem. Ges. **67** 434 (1934).

¹¹ Shinoda & Ueeda: Ber. dtsch. chem. Ges. **67** 434 (1934).

¹² Tschirch & Relander: Schweiz. Wochenschr. f. Chem. und Pharm. **189** (1898).

¹³ Bergmann: Biochem. Z. **267** 296 (1933).

Glycyrrhizins annimmt, bilden könnte, oder daß er nach Spaltung des Rohrzuckers aus Fruktose entstanden wäre.

III. Kohlenhydrate:

1) Monosaccharide: d-Glukose, wurde neben Mannit von Tschirch & Relander¹² im Filtrat des mit Schwefelsäure ausgefällten Glycyrrhizins gefunden.

2) Disaccharide: Saccharose. Das Vorkommen von beträchtlichen Mengen Rohrzucker wird von Rasenack¹⁴ und Houseman¹⁵ bestätigt. König¹⁶ gibt den Saccharosegehalt im spanischen Süßholz mit 2,1% und im russischen mit 10,4% an.

Im Süßholz liegen somit 4 Süß-Stoffe vor, nämlich Glycyrrhizin, d-Glukose, Saccharose und Mannit. Die ersteren drei wurden auf Vorschlag von Tschirch von Eriksson¹⁷ nacheinander in derselben Lösung in einem Arbeitsgang bestimmt. Quantitativ ausgewertet wurde dabei das verschiedene Verhalten der einzelnen Süßstoffe gegenüber Fehlingscher Lösung. Im lufttrockenen Süßholzpulver wurden nach dieser Methode folgende Werte gefunden:

für Glukose:	1,39—1,45 %
für Saccharose:	2,40—2,57 %
für Glycyrrhizin:	6,42—7,13 %

3) Polysaccharide: Stärke. Arnst & Hart¹⁸ fanden im spanischen Süßholz 31,3% und im russischen 20,7% Stärke. Diese Gehaltsunterschiede lassen sich wohl aus der Tatsache erklären, daß die Stärke sowohl im Parenchym der Rinde wie auch im Holzparenchym lokalisiert ist. Aus diesem Grunde dürfte das geschälte, russische Süßholz weniger Stärke enthalten.

Gummi. Dessen mengenmäßiger Anteil wird von Madsen¹⁹ mit 1,5—4% angegeben. Näheres ist über diesen gummosen Stoff bis anhin nicht bekannt geworden.

IV. Weitere Inhaltsstoffe:

Fett. Davon soll die Süßholzwurzel bis 3,5% enthalten. Tschirch¹⁹ fand nur 0,2—0,8%.

¹⁴ Rasenack: Arbeit d. kgl. Gesundheitsamtes 1908.

¹⁵ Houseman: Amer. Journ. Pharm. 84 531 (1912) und 88 97 (1916).

¹⁶ König: Nahr. und Genußm. II 1065.

¹⁷ Tschirch & Eriksson: Arch. Pharm. 249 144 (1911).

¹⁸ Arnst & Hart: Z. angew. Chem. 136 (1893).

l-Asparagin. $\text{NH}_2\text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$

Es wurde zuerst von Caventou¹⁹ im Süßholz aufgefunden und Agedoil genannt. Henry & Plisson (1828)¹⁹ fanden, daß es in chemischer Hinsicht mit dem von Vauquelin & Robiquet (1809)¹⁹ im Spargel aufgefundenen Asparagin übereinstimmte. Sestini²⁰ fand in der Wurzel davon 2—4 %.

Bitterstoffe. Sie sind in Wasser teilweise löslich, teilweise aber unlöslich. Von Houseman²¹ werden sie der Menge nach bis zu 10 % angegeben. Gerbstoff, Methylsalicylat (Desmoulière)¹⁹ und ein ätherisches Öl (0,03—0,035 %) finden sich nur in kleinen Mengen in der Droge vor.

e) Glycyrrhizin, ein Saponin

Um diese Frage beantworten zu können, muß man näher auf die Natur der Saponine eingehen. Mit dem Ausdruck «Saponin» bezeichnete Gmelin²² als erster einen aus der Wurzelrinde von Saponaria officinalis extrahierten, kratzenden Stoff. Heute verstehen wir darunter eine Gruppe pflanzlicher, normalerweise stickstofffreier Glykoside, welche Zellgifte sind. Sie weisen nach Kobert²³, Kofler²⁴, Leupin²⁵ und Lebeau²⁶ folgende physikalischen und physiologischen Eigenschaften auf:

Wegen ihrer großen Oberflächenaktivität ähneln sie den Seifen und liefern daher beim Schütteln ihrer wässrigen Lösung einen längere Zeit haltbaren Schaum. Infolge dieser Eigenschaft läßt sich ferner erklären, daß feine Niederschläge, Tierkohle etc. sich in wässrigen Medien bei ihrer Gegenwart nicht filtrieren lassen, sondern durchs Filter gehen. Die wässrigen Saponinlösungen sind kolloidal und lassen sich nicht dialysieren, auch wenn die Saponine gut kristallisieren. In Pulverform reizen die Saponine zum Niesen. Sie besitzen einen kratzenden Geschmack und wirken in größeren Mengen brechenenerregend. Noch in großen Verdünnungen sind sie imstande, rote Blutkörperchen aufzulösen. Durch Zusatz von Cholesterin wird diese hämolytische Wirkung aufgehoben, indem die Saponine mit Cholesterin eine Additionsverbindung eingehen.

¹⁹ Tschirch: Handbuch der Pharmakognosie 2. Auflage 169 (1937).

²⁰ Sestini: Gaz. chim. ital. 131 (1878) und Arch. Pharm. 233 (1880).

²¹ Houseman: Amer. Journ. Pharm. 84 531 (1912) und 88 97 (1916).

²² Gmelin: Handbuch d. theoret. Chemie 1819.

²³ Kobert: Ber. d. pharmazeut. Ges. 25 171 (1915).

²⁴ Kofler: Die Saponine Verlag Springer Wien 4 und 90 (1927).

²⁵ Leupin: Pharm. Acta Helv. 10 22 (1935).

²⁶ Lebeau: Traité de Pharm. Chimique 4 4095 (1947).

Alle Saponindrogenabkochungen erhöhen die Benetzbarkeit von Substanzen, die sonst von Wasser kaum benetzt werden. Sie hindern Kohlensäure am Entweichen aus kohlensauren Getränken, wie Bier und Brauselimonaden und halten unlösliche Partikelchen wie Schwefelsilber und schwefelsaures Barium feinsuspendiert, wodurch sie sich zur Herstellung von Suspensionen eignen.

In bezug auf die Löslichkeit in Wasser lassen sich zwei Gruppen von Saponinen unterscheiden. Die sogenannten neutralen Saponine sind in Wasser leicht löslich, im Gegensatz zu den sauren Saponinen, welche sich in verdünnten Alkalien, nicht aber in Wasser lösen. Die Saponine sind mit wenigen Ausnahmen amorphe Substanzen, die sich außer in Wasser auch noch in Methylalkohol und heißem, verdünntem Aethylalkohol lösen, in konz. Aethylalkohol und Aceton sind sie nur wenig löslich und in kaltem konz. Alkohol, in Aether und Petrolaether sind sie unlöslich. Sie sind optisch aktiv. Mit konz. Schwefelsäure geben sie eine charakteristische Färbung von gelb über rot in blaugrün oder blauviolett.

Bei der Hydrolyse werden die Saponine gespalten in den Zuckerteil (Hexosen: Glukose, Fruktose und Galaktose; Pentosen: Arabinose und Xylose; Methylpentosen: Rhamnose, und die Kohlehydratsäuren: Galakturonsäure und Glukuronsäure) und den Nicht-Zucker, das Sapogenin. Je nachdem leichter oder schwerer abspaltbare Zucker an der Glykosidbildung beteiligt sind, entstehen bei der Hydrolyse von Saponinen zuerst zuckerärmere Spaltprodukte, die sogenannten Anfangssapogenine, und nachher erst die zuckerfreien Spaltlinge, die Endsapogenine. Letztere sind in Wasser unlöslich und verhältnismäßig leicht in kristallisiertem Zustande zu erhalten.

Was die elementare Zusammensetzung der Saponine betrifft, konnte bis vor nicht allzu langer Zeit nur gesagt werden, daß sie aus C, H und O bestehen und zur großen Gruppe der Glykoside gehören. Flückiger²⁷ und später Kobert²⁸ stellten für die Saponine folgende Reihenformeln auf:

Formel von Flückiger²⁷: $C_n H_{2n-10} O_{13}$

Formel von Kobert²⁸: $C_n H_{2n-8} O_{10}$ oder $C_n H_{2n-16} O_{28}$

Windaus²⁹ und Kofler³⁰ finden diese Reihenformeln überholt und unzutreffend. Zur weiteren Aufklärung der Konstitution der Saponine wurden außer der Hydrolyse meistens

²⁷ Flückiger: Arch. Pharm. **210** 532 (1877).

²⁸ Kobert: Real-Enzyklopädie d. ges. Heilkunde 4. Aufl.

²⁹ Windaus: Nachr. d. Ges. d. Wiss. Göttingen Math. phys. Kl. Sitz vom 24. 7. 1925.

³⁰ Kofler: Die Saponine Verlag Springer Wien 91 (1927).

Abbauversuche an den Sapogeninen vorgenommen. Ruzicka^{31, 32, 33} fand, daß gewisse Sapogenine entweder Triterpene oder doch damit sehr nahe verwandte Körper sind, welche bei der Dehydrierung mit Selen, oft auch mit Palladium, Sapotalin, das 1, 2, 7-Trimethylnaphthalin liefern.

Hierher gehören folgende Sapogenine:

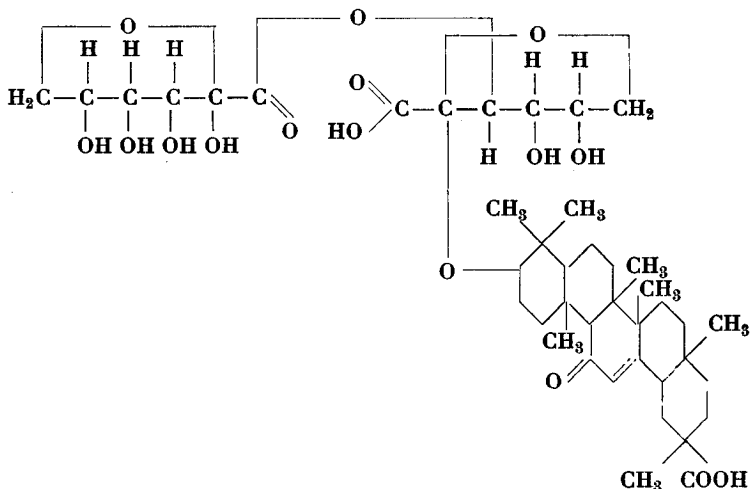
Oleanolsäure	$C_{30}H_{48}O_3$	(Guajaksapogenin)
Hederagenin	$C_{30}H_{48}O_4$	
Gypsogenin	$C_{30}H_{46}O_4$	
Glycyrrhetinsäure	$C_{30}H_{46}O_4$	

Im Gegensatz dazu gibt es noch eine Gruppe von Sapogeninen, welche ein sterinartiges Gerüst besitzen und bei der Dehydrierung kein Sapotalin liefern. Dazu gehört das Saponin der Digitalis, das Digitonin.

Im folgenden seien nun die wichtigsten chemischen und physikalischen Eigenschaften und physiologischen Wirkungen der Glycyrrhizinsäure aufgeführt und mit denen der Saponine verglichen.

1) Chemische Eigenschaften der Glycyrrhizinsäure:

Glycyrrhizinsäure = Glycyrrhizin besitzt nach dem heutigen Stand der Forschung die Bruttoformel $C_{42}H_{62}O_{16}$ und kann aufgelöst werden in folgende Konstitutionsformel:



³¹ Ruzicka: Z. physiol. Chem. 184 69 (1929).

³² Ruzicka: R. 48 1018 (1929).

³³ Ruzicka: Helv. Chimie. Acta 15 431 (1932).

Molekulargewicht: 822,91 , aus Titration: 824

In der Pflanze liegt die Glycyrrhizinsäure nicht frei und auch nicht als Ammoniumsalz vor, sondern gebunden an Kalium und Kalzium in einer Menge von 6—14 % nach Klein³⁴ und Tschirch & Cederberg³⁵.

Mit der Isolierung und Identifizierung des Glycyrrhizins haben sich zahlreiche Forscher seit sehr langer Zeit beschäftigt. Die wesentlichsten Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefaßt. Es seien deshalb nur noch die letzten Resultate über die Zusammensetzung des Glycyrrhizinsäuremoleküls angeführt.

1) Glycyrrhizin ist eine 3-basische Säure, deren saure Ammonium- und Kaliumsalze gut kristallisieren und einen intensiven süßen Geschmack besitzen.

2) Glycyrrhizin ist ein Glykosid beziehungsweise ein Glukuronid. Es zerfällt bei der hydrolytischen Spaltung in die Zuckerkomponente und das Aglukon. Ueber die Konstitution des Zuckerteils kann bis heute nichts Endgültiges gesagt werden.

Grießmeyer³⁶ beobachtete als einer der Ersten, daß aus Glycyrrhizin durch kochende verd. Mineralsäuren, ja sogar durch kochendes Wasser, neben dem Aglukon ein gärungsfähiger Zucker entsteht. Dieser Zucker wurde durch Habermann³⁷ näher untersucht. Er vermutete das Vorliegen einer Zuckerdikarbonsäure, die er Para-Zuckersäure nannte. Tschirch & Cederberg³⁸ betrachteten die Zuckerkomponente als Uronsäure und vermuteten Glukuronsäure. Ein Jahr später bestätigten Tschirch & Gauchmann³⁹ scheinbar diese Vermutung. Durch eine quantitative Uronsäurebestimmung stellten Karrer & Mitarbeiter⁴⁰ noch einmal das Molverhältnis von Aglukon zu Uronsäure fest, so wie es von Tschirch & Cederberg angegeben wurde. Erst Bergmann⁴¹ bezweifelte das Vorhandensein von Glukuronsäure als Zuckerkomponente. Er vermutete vielmehr Mannuronsäure als Bestandteil des Glycyrrhizins. Diese Feststellung machten auch Voß & Pfirsichke⁴², welche aus Glycyrrhizinsäure die Glukuronsäure herstellen wollten. Durch Alkohololyse mit methanolischer Salzsäure gelang es ihnen festzustellen, daß die

³⁴ Klein: Handb. d. Pflanzenanalyse III/2 1130 (1932).

³⁵ Tschirch & Cederberg: Arch. Pharm. 245 109 (1907).

³⁶ Grießmeyer: Diepl. pol. J. 209 228 (I. B.) 26 847 (1873).

³⁷ Habermann: Wien. Sitzungsber. 2. Abt. 80 731.

³⁸ Tschirch & Cederberg: Arch. Pharm. 245 106 (1907).

³⁹ Tschirch & Gauchmann: Arch. Pharm. 246 550 (1908).

⁴⁰ Karrer: Helv. Chim. Acta 4 100 (1921).

⁴¹ Bergmann: Biochem. Z. 267 305 (1933).

⁴² Voß & Pfirsichke: Ber. dtsch. chem. Ges. 70 132 (1937).

bereits bekannte monomere Uronsäure als Diuronsäure vorliegt. Letztere vermochten sie in Form feiner Nadeln als Methyl-dihexuronsäure-Dimethylester zu isolieren. Den letzten Beitrag zur Kenntnis der in der Glycyrrhizinsäure enthaltenen Uronsäure lieferte Ringel⁴³. Nach ihm handelt es sich dabei um eine 2-Ketohexonsäure, die als Disaccharid auftritt und keine glykosidische Bindung besitzt, wie sie die bekannten Disaccharide aufweisen. Nach Ringels Forschungen liegt mit der größten Wahrscheinlichkeit die 2-Keto-d-Galaktonsäure vor.

Weiter sind die Arbeiten gediehen bei der Erforschung des Aglukons der Glycyrrhizinsäure, dank Karrer⁴⁴, Bergmann⁴⁵, Ruzicka & Mitarbeiter⁴⁶ und Voß & Mitarbeiter⁴⁷. In einer Dissertation von Leuenberger⁴⁸ kam der Verfasser zu folgenden Ergebnissen:

a) Die von Voß⁴⁹ vorgeschlagene Bruttoformel der Glycyrrhetinsäure $C_{30}H_{46}O_4$ konnte endgültig gesichert werden. Dadurch muß die Glycyrrhetinsäure in die Klasse der Triterpene eingereiht werden.

b) Er konnte beweisen, daß die Glycyrrhetinsäure ein pentacyclisches Kohlenstoffgerüst besitzt, daß sie eine Monoxykarbonsäure mit einer α , β -ungesättigten Ketogruppe darstellt und daß die Ketogruppe wahrscheinlich in β -Stellung zur Karboxylgruppe steht.

c) Er zeigte ferner, daß die bei der Glycyrrhetinsäure auftretende Uneinheitlichkeit, wahrscheinlich sowohl durch Polymorphie als auch durch Isomerie (Stereoisomerie) bedingt ist.

d) Was die Konstitutionsformel der Glycyrrhetinsäure betrifft, steht bis jetzt aus den Abbauversuchen nur das Picengerüst fest. Aus Analogiegründen heraus kann man jedoch annehmen, daß die Dehydrierungsprodukte, speziell das Sapotalin, aus demselben Molekülstück entstanden sind, wie bei den Amyrinen. Nimmt man weiter an, daß auch die übrigen Methylgruppen bei der Glycyrrhetinsäure gleich angeordnet sind, wie bei den meisten andern Triterpenen, so kann man dafür folgende Struktur aufstellen:

⁴³ Ringel: Zur Kenntnis des Zuckerteils des Glycyrrhizins Diss. Breslau 1939.

⁴⁴ Karrer: Helv. Chim. Acta 4 100 (1921).

⁴⁵ Bergmann: Biochem. Z. 267 305 (1933).

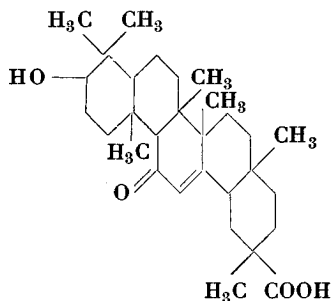
⁴⁶ Ruzicka: Helv. Chim. Acta 20 804 und 1271 (1937).

⁴⁷ Voß: Ber. dtsh. chem. Ges. 70 122 (1937).

⁴⁸ Leuenberger: Zur Kenntnis der Glycyrrhetinsäure Diss. ETH Zürich (1938).

⁴⁹ Voß & Pfirschke: Ber. dtsh. chem. Ges. 70 132 (1937).

Glycyrrhetinsäure :



Die Frage, ob die Glycyrrhizinsäure nach ihrer chemischen Zusammensetzung zu den Saponinen zu rechnen ist, glaubte Kobert⁵⁰ verneinen zu müssen, da er die von Tschirch & seinen Mitarbeitern⁵¹ aufgestellte Glycyrrhizinsäure-Formel $C_{44}H_{64}O_{19}$ seinen Berechnungen zu Grunde legte. Mit der jetzt wohl endgültig gesicherten Bruttoformel für Glycyrrhizin, $C_{42}H_{62}O_{16}$ würde letztere um 4 Moleküle H_2O vermehrt, beinahe in die Reihenformel $C_n H_{2n-8} O_{10}$ passen. Schreibt man die Formel $C_{42}H_{70}O_{20}$ als $(C_{21}H_{35}O_{10})_2$, so unterscheidet sie sich einzig noch um ein Wasserstoff-Atom von Koberts Reihenformel⁵⁰. Da man überdies das Aglukon des Glycyrrhizins als ein Naphtholderivat auffaßte, glaubte Kobert⁵⁰ das Glycyrrhizin nicht zu den Saponinen rechnen zu dürfen, obwohl es sich in bezug auf die physikalischen und physiologischen Eigenschaften den Saponinen gegenüber ähnlich verhielt.

Mit der Entdeckung der triterpenartigen Struktur der Glycyrrhetinsäure muß das Glycyrrhizin nun doch zu den Saponinen gezählt werden. Die Dehydrierung mit Selen ergab bei folgenden Sapogeninen und verwandten Substanzen nach Ruzicka & van Veen⁵² Sapotalin: bei Aescigenin, Caryocapsapogenin, Gypsogenin, Cyclamiretin, Guajaksapogenin, Glycyrrhetinsäure, Hederagenin, Mimosopssapogenin, (identisch mit dem Sapogenin aus *Achras sapota*), Quillajasapogenin, Urolsäure (oder Urson), Zuckerrübensapogenin und dem Triterpenderivat Betulin.

Des weitern verhalten sich bestimmte Untergruppen der Triterpene in ihrem Bau und ihren Eigenschaften sehr ähnlich. Ruzicka & Marxer⁵³ bewiesen durch gegenseitige Umwandlungen dieser Triterpene ihre Vermutungen. Danach lassen sich die Triterpene in vier Untergruppen einteilen, näm-

⁵⁰ Kobert: Ber. d. sch. pharm. Ges. 25 171 (1915).

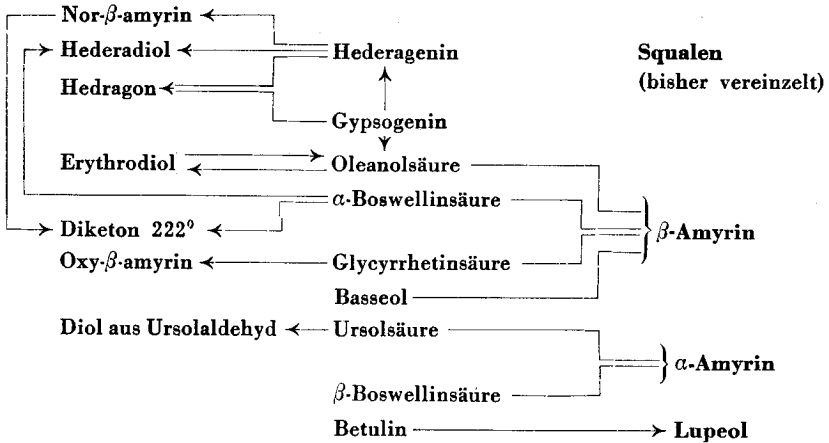
⁵¹ Tschirch & Mitarbeiter: Arch. Pharm. 245 107 (1907)

⁵² Ruzicka & van Veen: Zeitschr. physiol. Chemie 184 69 (1929).

⁵³ Ruzicka & Marxer: Helv. Chim. Acta 23 144 (1940).

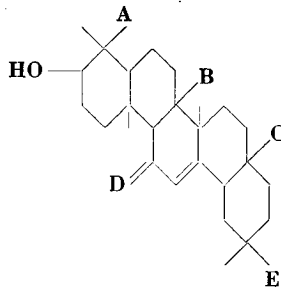
lich: in die des Squalens, des α -Amyrins, des β -Amyrins und des Lupeols. Die Glycyrrhetinsäure gehört zur Gruppe des β -Amyrins, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist:

Tabelle 4



In der nachstehenden Zusammenstellung seien noch einige Körper aufgeführt, die alle das gleiche Grundskelett aufweisen, und sich nur durch verschiedene Substitutionen voneinander unterscheiden.

Triterpenartiger Grundkörper:



	A	B	C	D
Hederagenin	CH ₂ OH	CH ₃	COOH	H ₂
Gypsogenin	CHO	CH ₃	COOH	H ₂
Erythrodiol	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OH	H ₂
Oleanolsäure	CH ₃	CH ₃	COOH	H ₂
Glycyrrhetinsäure . . .	CH ₃	COOH	CH ₃	O
α -Boswellinsäure . . .	COOH	CH ₃	CH ₃	H ₂
β -Amyrin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H ₂

Nach den neuesten Untersuchungen von R u z i c k a & M i t a r b e i t e r n ⁵⁴ befindet sich die Carboxylgruppe in der Glycyrrhetinsäure nicht in Stellung B, sondern in Stellung E. So-

mit steht hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung die Saponinnatur des Glycyrrhizins eindeutig fest.

3) Glycyrrhizinsäure enthält keinen Stickstoff, wie ursprünglich fälschlicherweise von einigen Forschern wie Lade⁵⁵, Roussin⁵⁶ und Habermann⁵⁷ angenommen worden ist. Als erster fand Vogel⁵⁸, daß die Glycyrrhizinsäure stickstofffrei sei. Erst Tschirch & Cederberg⁵⁹ gelang es, die Glycyrrhizinsäure in stickstofffreiem, kristallisiertem Zustande zu erhalten, was später nochmals eingehend durch Karrer & seine Mitarbeiter⁶⁰ bestätigt wurde. Auch in dieser Hinsicht stimmt daher das Glycyrrhizin mit den Saponinen überein, die ebenfalls mit einer einzigen, fraglichen Ausnahme (dem stickstoffhaltigen Alfalfasaponin) alle nur aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff bestehen.

4) Glycyrrhizin gibt mit konzentrierter Schwefelsäure die für Saponine charakteristische Farbreaktion. Wird eine Spur Glycyrrhizinsäure mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt, so tritt zuerst eine Gelbfärbung auf, die allmählich über orange ins rötliche umschlägt. Sieburg⁶¹ erklärte die Schwefelsäurereaktion der Saponine damit, daß aus der Zuckerkomponente Furfurol gebildet wird, welches sich dann mit dem Hydroxyle und Methoxyle enthaltenden Aglukon kondensiert. — Nach vander Haar⁶² ist dies jedoch nicht richtig, da auch die zuckerfreien Sapogenine dieselbe Reaktion geben. Auf Grund seiner Untersuchungen vermutet er vielmehr, daß allen Sapogeninen ein gemeinsamer Terpenkern zugrunde liege, auf den die Schwefelsäurereaktion zurückzuführen sei. Auch hierin erweist sich somit das Glycyrrhizin als ein Saponin.

2) Physikalische Eigenschaften der Glycyrrhizinsäure

1) Oberflächenaktivität: Wäßrige Süßholzauszüge sowie wäßrige Lösungen von Glycyrrhizinsäure und ihren Salzen, schäumen beim Schütteln wie Saponinlösungen sehr stark. Die Ph. H. V. verlangt von einem 0,1 %igen wäßrigen

⁵⁴ Ruzicka & Mitarbeiter: *Helv. Chim. Acta* **26** 265 (1943).

⁵⁵ Lade: *Ann. Chem.* **59** 224 (1846).

⁵⁶ Roussin: *J. Pharm. Chim.* **22** 6 (1875).

⁵⁷ Habermann: *Ann. Chem.* **197** 105 (1879).

⁵⁸ Vogel: *J. prakt. Chem.* **28** 1 (1843).

⁵⁹ Tschirch & Cederberg: *Arch. Pharm.* **245** 97 (1907).

⁶⁰ Karrer & Mitarbeiter: *Helv. Chim. Acta* **4** 100 (1921).

⁶¹ Sieburg: Abderhalden, *Handbuch d. biolog. Arbeitsmeth. Abt. I* Teil **10** S. 545.

Biochem. Z. **74** 371 (1916).

⁶² vander Haar: *Biochem. Z.* **76** 333 (1916).

Ber. dtsch. chem. Ges. **55** 1054 (1922).

Süßholzauszug, daß nach einer Stunde noch ein Schaumring vorhanden sei.

Süßholzabkochungen vermögen auch unlösliche Partikelchen feinsuspendiert zu halten und eignen sich daher zur Herstellung von Emulsionen. Wie Saponindrogenabkochungen erhöhen Süßholzauszüge die Benetzbarkeit von Substanzen und hindern Kohlensäure am Entweichen aus kohlensauen Getränken.

2) Löslichkeit: Glycyrrhizinsäure liegt in wäßriger Lösung wie die Saponine kolloidal vor. Eine heiße Lösung derselben erstarrt beim Abkühlen zu einer Gallerte. Was die Löslichkeit des Saponins und des Sapogenins in verschiedenen Lösungsmitteln betrifft, findet man in der Literatur die widersprechendsten Angaben. Sie seien in folgenden Tabellen im wesentlichen zusammengefaßt:

Tabelle 5 **Eigenschaften der Glycyrrhizinsäure**

Autor	Löslich in	Wenig löslich in	Unlöslich in
Merck ⁶³	siedendem Wasser verdünntem Alkohol heißem Eisessig verdünnten Alkalien		kaltem Wasser Alkohol Aether
Klein ⁶⁴	verdünntem, heißem Alkohol heißem Wasser		Aether absolutem Alkohol
Kroeber ⁶⁵	heißem, verdünntem Alkohol heißem Wasser		Aether absolutem Alkohol
Wattiez & Sternon ⁶⁶	heißem Wasser verdünntem Alkohol Chloroform	Aether	kaltem Wasser
Lebeau & Courtois ⁶⁷	heißem Wasser heißem verdünntem Alkohol Essigsäure		kaltem, absolutem Alkohol Aether
Tschirch & Cederberg ⁶⁸	verdünntem Alkohol Methylalkohol Eisessig wasserhaltigem Aceton heißem Wasser	absolutem Alkohol	Aether Chloroform
Hardegger ⁶⁹	verdünntem Alkohol wäßrigem Dioxan heißem Wasser		Aether absolutem Alkohol kaltem Wasser

⁶³ Merck: Saponine Nr. 42 53 (1929).

⁶⁴ Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse III/2 1131 (1932).

Tabelle 6

Löslichkeit der Glycyrrhetinsäure

Autor	Löslich in	Wenig löslich in	Unlöslich in
Tschirch & Cederberg ⁷⁰	Alkohol	Aether	
Merck ⁷¹	Alkohol		Aether Wasser
Leuenberger ⁷²	Alkohol Chloroform Aceton		
Leemann ⁷³	Wasser		Laugen

Aus diesen Zusammenstellungen kann man entnehmen, daß sowohl das Glycyrrhizin wie auch die Glycyrrhetinsäure sich weitgehend wie ein Saponin bzw. Sapogenin verhalten. Die sich oft widersprechenden Löslichkeitsangaben der einzelnen Autoren werden wohl von dem verschiedenen Reinheitsgrad der Produkte, die sie gerade in den Händen hatten, herrühren.

3) **Optische Aktivität:** Die optische Aktivität der Saponine wurde lediglich dem Gehalte an gebundenen Zuckern zugeschrieben ⁷⁴, bis es Rosenthaler & Ström ⁷⁵ gelang, ein zuckerfreies, rechtsdrehendes Sapogenin darzustellen. Was nun die Glycyrrhizinsäure und die Glycyrrhetinsäure anbelangt, sind beide anfänglich als optisch inaktiv betrachtet worden. Erst Bergmann ⁷⁶ gelang es, deren optische Aktivität festzustellen. Im Folgenden seien die Drehwerte der verschiedenen in der Literatur beschriebenen Produkte mit den dazugehörigen Schmelzpunkten wiedergegeben:

Aus der tabellarischen Zusammenstellung kann man entnehmen, daß sowohl das Saponin wie auch das Sapogenin rechts drehen, wovon letzteres beträchtlich mehr. Auffallend ist

- ⁶⁵ Kroeber: Das neuzeitliche Kräuterbuch 341 (1934).
⁶⁶ Wattiez & Sternon: *Eléments de Chimie végétale* 270 (1942).
⁶⁷ Lebeau & Courtois: *Traité de Pharmacie Chimique* IV 4105 (1947).
⁶⁸ Tschirch & Cederberg: *Arch. Pharm.* **245** 101 (1907).
⁶⁹ Hardegger: P.D. Dr. E. Hardegger, Organ. chem. Labor., ETH Zürich: persönliche Mitteilung.
⁷⁰ Tschirch & Cederberg: *Arch. Pharm.* **245** 101 (1907).
⁷¹ Merck: Saponine No. 42 53 (1929).
⁷² Leuenberger: Zur Kenntnis der Glycyrrhetinsäure Diss. ETH Zürich 1938.
⁷³ Leemann: Schweiz. Apoth. Ztg. **85** 247 (1947).
⁷⁴ Kobert: Abderhaldens Biochem. Handlexikon VII 148.
⁷⁵ Rosenthaler & Ström: *Arch. Pharm.* **250** 291 (1912).
⁷⁶ Bergmann: *Biochem. Z.* **267** 296 (1933).

Tabelle 7

Autor	Glycyrrhizinsäure		Glycyrrhetinsäure	
	Schmelzpunkt	Optische Drehung	Schmelzpunkt	Optische Drehung
Tschireh & Mitarbeiter 1907—1908	205 °	Inaktiv	210 °	Inaktiv
Karrer & Mitarbeiter 1921	220 °	Inaktiv	297—298 ° (unkorr.)	Inaktiv
Bergmann ⁷⁷ 1933	—	+ 62,1 (in verdünnter Essigsäure)	303 ° (korr.)	+ 145,5—146 (in Dioxan)
Voß & Mitarbeiter ⁷⁸ 1936—1937	—	+ 58,5 in absolutem Alkohol)	α 283 ° (unkorr.) β 296 ° (unkorr.)	+ 140 (in absolutem Alkohol) + 86 (in absolutem Alkohol)
Ruzicka & Leuenberger ⁷⁹ 1936	—	—	α 287—293 ° (korr.) β 300—304 ° (korr.)	+ 163 (in Chloroform) + 161 (in Chloroform)
Ruzicka, Furter & Leuenberger ⁸⁰ 1937	—	—	α 296 ° β 298 °	—

des weitern, daß Voß & Mitarbeiter⁸¹ die optische Drehung der Glycyrrhizinsäure in absolutem Alkohol vorgenommen haben, was nach den Löslichkeitsangaben der meisten Autoren (siehe diesbezügliche Tabelle) gar nicht möglich wäre.

3) Physiologische Eigenschaften der Glycyrrhizinsäure:

1) Hämolytischer und Fisch-Index: Tocco⁸² leistete einen Beitrag zur Kenntnis der Beziehungen zwischen physiologischer Wirkung und physikalischen Eigenschaften, speziell zwischen der Oberflächenaktivität und der Giftwirkung einzelner Saponine. Der Begriff hämolytischer Index be-

⁷⁷ Bergmann: ebenda und *Helv. Chim. Acta* **20** 207 (1937).

⁷⁸ Voß & Mitarbeiter: *Z. angew. Chemie* **49** 556 (1936) und *Ber. dtsh. chem. Ges.* **70** 132 (1937).

⁷⁹ Ruzicka & Leuenberger: *Helv. Chim. Acta* **19** 1405 (1936).

⁸⁰ Ruzicka, Furter & Leuenberger: *Helv. Chim. Acta* **20** 314 (1937).

⁸¹ Voß & Mitarbeiter: *Z. angew. Chemie* **49** 556 (1936) und *Ber. dtsh. chem. Ges.* **70** 132 (1937).

⁸² Tocco: *Biochem. Z.* **129** 64 (1922).

darf wohl keiner weiteren Erklärung. Unter Fischindex versteht man dagegen die Saponinkonzentration, bei der Rotaugen (*Leuciscus rutilus*) von 0,1—0,5 g Gewicht innerhalb einer Stunde abgetötet werden. Untersucht wurden von Tocco⁸² Glycyrrhizin, Digitonin, Primulin u. a. m. Er fand, daß die Toxizität nicht den Kurven für die Oberflächenspannungen der einzelnen Saponine folgt. Betreffs der hämolytischen Eigenschaft des Glycyrrhizins liegen die widersprechendsten Angaben vor. Rühle⁸³, Halberkann⁸⁴, Kobert,⁸⁵ u. a. m. betrachten Glycyrrhizin sowie das Natriumsalz davon als hämolytisch unwirksam. Einzig Tocco⁸⁶ berichtet, daß das wirksame Prinzip der Süßholzwurzel, das Glycyrrhizin, noch in einer Verdünnung von 1 : 2000 in zirka 2 Stunden hämolytisch wirkt, die bei einer Verdünnung von 1 : 4000 in 6 Stunden aber unvollkommen ist. Wenn auch das Glycyrrhizin hämolytisch unwirksam ist, so ist es deshalb doch keineswegs aus der Gruppe der Saponine auszuschließen. Es ist vielleicht eben auch ein Glied der Untergruppe der unwirksamen Saponine, zu der z. B. auch das neutrale Guajakrindensaponin gehört.

Die eigenen Untersuchungen der Glycyrrhizinsäure auf ihre hämolytische Wirkung werden im experimentellen Teil beschrieben.

2) Die weitere pharmakologische Prüfung des Glycyrrhizins durch Tocco⁸⁷ ergab in einem meist 4 %igen wäßrigen, neutralem Süßholzauszug:

Per os unschädlich.

Parenteral für alle Versuchstiere tödlich unter allgemeinen Depressionserscheinungen seitens des Herzens und des Zentralnervensystems.

Endolumbal injiziert bewirkt die Lösung Verlust der Sensibilität, völlige Paraplegie, schließlich Tod, ebenso bei unmittelbarer Einführung in das Gehirn, schon in intravenös unschädlichen Gaben. Bei unmittelbarer Einwirkung auf das Herz verursacht sie zunächst durch Hemmung der Vaguswirkung Pulsbeschleunigung, dann Pulsverlangsamung, schließlich Lähmung durch Schädigung des Myokards. Auf periphere Nerven und Muskulatur übt sie ebenfalls eine echt depressorische, dann völlig lähmende Wirkung

⁸³ Rühle: Unters. Nahrungs- und Genußmittel 16 165 (1908) und 23 566 (1912).

⁸⁴ Halberkann: Sonderdruck aus Deutsch. Min.-Wasser-Fabr. Ztg. 1902 No. 25—30.

⁸⁵ Kobert: Ber. dtsh. pharm. Ges. 25 174 (1915).

⁸⁶ Tocco: Arch. internat. de pharmacodyn. et de therap. 28 445.

⁸⁷ Tocco: Arch. internat. de pharmacodyn. et de therap. 28 11 (1923) und Ber.ges Physiolog. 24 503 (1924).

aus und durch Lähmung der Geschmacksnerven kann der bittere Geschmack des Chinins aufgehoben werden. Eine 1 %ige Lösung verursacht örtlich Conjunctivitis. Es besteht weder kumulative Wirkung des Giftes noch Gewöhnung an dasselbe. Von per os eingeführter Substanz wird nur sehr wenig innerhalb einer halben Stunde durch den Harn, die Hauptmenge jedoch in 24 Stunden durch den Kot ausgeschieden. Dabei tritt sicher keine Aenderung der pharmakologischen, wahrscheinlich auch keine der chemischen Eigenschaften ein. Abgesehen vom Magen- und Darmkanal reichert sich das Glycyrrhizin in der Leber und Gallenblase an, nach subkutaner Injektion hauptsächlich in Nieren und Harn.

3) Nach Velluz⁸⁸ kommt dem Glycyrrhizin noch die bemerkenswerte Eigenschaft zu, Tetanustoxin in hohem Maße zu binden und dadurch unschädlich zu machen. Versetzt man danach Tetanustoxin, von dem bereits $\frac{1}{800}$ ccm (0,00125 ccm) eine tödliche Dosis für das Meerschweinchen darstellt, mit einer 0,5 %igen Lösung von Ammoniumglycyrrhizinat, so ist die Mischung nach 4stündigem Stehen bei 38—39° für das Meerschweinchen nicht mehr giftig. 5 mg Glycyrrhizinsäure genügen demnach, um 800 letale Dosen von Tetanustoxin zu entgiften, d. h. in ein Kryptotoxin überzuführen. Diese entgiftende Wirkung kommt speziell der Glycyrrhetinsäure zu.

Obwohl beinahe alle chemischen, physikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des Glycyrrhizins mit denjenigen der Saponine übereinstimmen, läßt Tocco⁸⁹ die Frage dessen Zugehörigkeit zu dieser Gruppe offen.

Nach dem oben Dargelegten und nach dem heutigen Stand der Forschung ist aber das Glycyrrhizin mit Recht zu den Saponinen zu zählen, da die Zuordnung von Glykosiden zu dieser Gruppe heutzutage in erster Linie auf Grund der strukturechemischen Zusammensetzung und nicht auf Grund ihrer physikalischen und physiologischen Eigenschaften erfolgt.

f) Anwendung

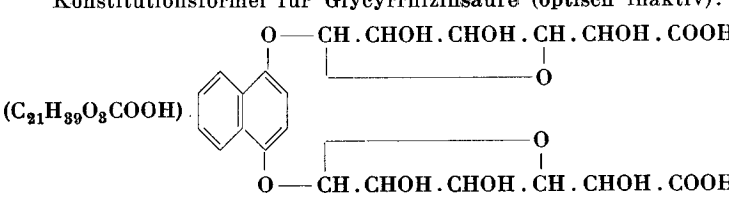
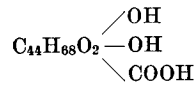
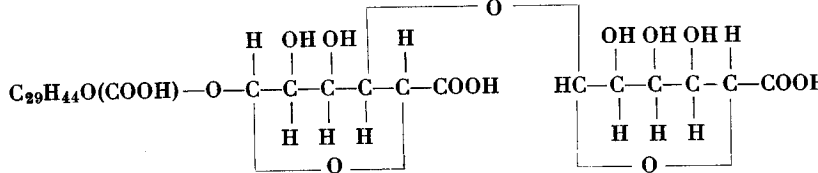
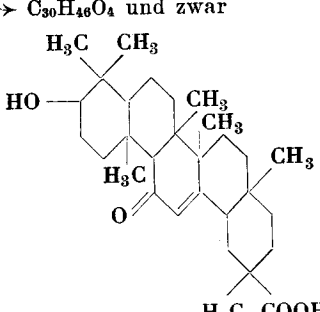
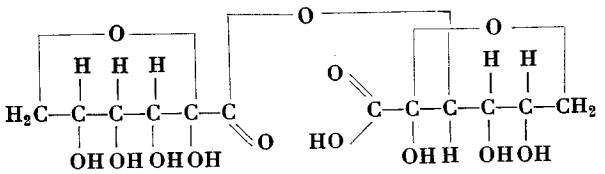
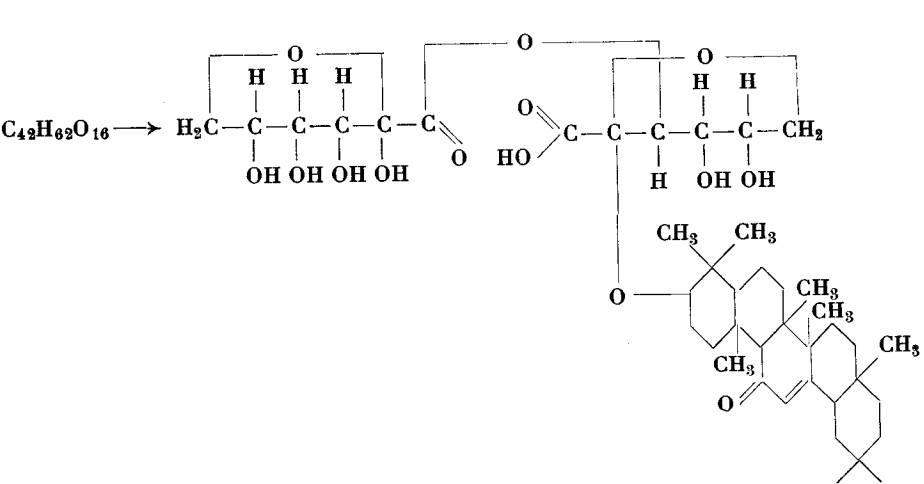
Das Süßholz wurde bereits Jahrtausende vor Christi Geburt als Arzneimittel benützt und gehört somit zu den ältesten Drogen. Es wurde damals schon, wie aus einem ägyptischen Papyrus hervorgeht, bei Katarrhen der Luftwege verwendet. Den Lakritzensaft erwähnt zum ersten Male Conrad von Megenberg im 14. Jahrhundert. Leonhart Fuchs (1543) und P. A. Matthioli berichten übereinstimmend mit Hieronymus Bock (1577) und Tabernaemontanus-Bauhinus (1731) von den man-

⁸⁸ Velluz: *Mereks Jahresbericht* 46 178 (1932).

⁸⁹ Tocco: *Biochem. Z.* 129 64 (1922).

Tabelle 8

GLYCYRRHIZIN-SÄURE

Brutto-Formel	Form	Weitere Eigenschaften	Autor	Literatur-stelle
$C_{16}H_{26}O_6$	amorph	C = 61,65 %; H = 7,66 %	Vogel	J. prakt. Chem. 28, 1 (1843)
$C_{36}H_{48}O_{14}$			Lade	Ann. Chem. 59, 224 (1846)
$C_{48}H_{72}O_{18}$	amorph	Glykosid $\xrightarrow[\text{verd. Säuren}]{\text{Spaltung mit}}$ $\begin{cases} \text{vergärb. Zucker mit 12 C-Atomen} \\ \text{Aglukon } C_{36}H_{52}O_{18} \text{ (Glycyrrhetin)} \end{cases}$	v. Gorup-Besanez	Ann. Chem. 118, 236 (1861)
$C_{44}H_{68}NO_{18}$	amorph	3-basische Säure, bildet neutrale und saure, kristalline Salze Freie amorphe Säure reduziert Fehlingsche Lösung Glykosid $\xrightarrow[\text{verd. } H_2SO_4]{\text{Spaltung mit}}$ $\begin{cases} \text{Säure = Parazuckersäure} \\ \text{Aglukon } C_{32}H_{48}NO_4 \text{ (Glycyrrhetin)} \end{cases}$	Habermann	Ann. Chem. 197, 105 (1879)
	kristallin	auch kristalline, saure Salze $\xrightarrow{\text{Hydrolyse}}$ $\begin{cases} \text{kristall. Pulver (Glycyrrhetin)} \\ \text{vergärb. Zucker} \\ \text{Säure} \end{cases}$	Tschirch & Relander	Schweiz. Wschr. Chem. & Pharm. 189 (1898)
$C_{44}H_{64}O_{19}$	kristallin	auch kristalline, saure Salze, Molekulargewicht aus Titration 892,85 (berechnet 896,6)	Tschirch & Cederberg	Arch. Pharm. 245, 97 (1907)
$C_{44}H_{64}O_{19}$	kristallin	$C_{44}H_{64}O_{19} \xrightarrow[+ 2H_2O]{\text{Hydrolyse}}$ $\begin{cases} C_{31}H_{45}O_3(OH)_2 \cdot COOH \text{ (Glycyrrhetinsäure)} \\ 2COOH-(CHOH)_4-CHO \text{ (Glukuronsäure)} \end{cases}$ Konstitutionsformel für Glycyrrhizinsäure (optisch inaktiv): 	Tschirch & Gauchmann	Arch. Pharm. 246, 545 (1908) 247, 121 (1909)
	kristallin	Glycyrrhizinsäure \rightarrow $\begin{cases} 2 \text{ Moleküle Glukuronsäure} \\ 1 \text{ Molekül Glycyrrhetinsäure } C_{45}H_{72}O_6 = \end{cases}$ 	Karrer & Chao	Helv. Chim. Acta 4, 100 (1921)
$C_{30}H_{46}O_{13}$		$C_{30}H_{46}O_{13} \xrightarrow[+ H_2O]{\text{Hydrolyse}}$ $\begin{cases} C_{23}H_{36}O_3 \text{ (Glycyrrhetinsäure)} \\ \text{optisch aktiv} \end{cases} + CH_2 + H_2O + C_6H_{10}O_7$ $C_6H_{10}O_7$ reagiert sauer, wirkt reduzierend und gibt alle charakteristischen Reaktionen auf Uronsäuren. Vermutung: Mannuronsäure.	Bergmann	Biochem. Z. 267, 296 (1933)
$C_{42}H_{62}O_{16}$		$C_{42}H_{62}O_{16} \xrightarrow[\text{methanolischer Salzsäure}]{\text{Alkoholyse mit}}$ $\begin{cases} 1 \text{ Molekül Glycyrrhetinsäure } C_{30}H_{46}O_4 \\ 1 \text{ Molekül einer Diuronsäure} \\ (= 2 \text{ Moleküle Mannuron- oder Galakturonsäure}) \end{cases}$ Konstitutionsformel für Glycyrrhizinsäure (optisch aktiv) 	Voß & Mitarbeiter	Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 122 (1937) 70, 132 (1937)
$C_{42}H_{62}O_{16}$	kristallin	Saponin, 3-basische Säure \rightarrow $\begin{cases} 2 \text{ miteinander verknüpfte Uronsäuren} \\ C_{30}H_{46}O_4 \text{ und zwar} \end{cases}$ 	Leuenberger	Zur Kenntnis der Glycyrrhetinsäure, Diss. ETH Zürich 1938
$C_{42}H_{62}O_{16}$	kristallin	Glykosid \rightarrow $\begin{cases} C_{30}H_{46}O_4 \\ \text{Disaccharid einer 2-Keto-hexonsäure und zwar:} \end{cases}$ 	Ringel	Zur Kenntnis des Zuckerteils des Glycyrrhizins Diss. Breslau 1939
$C_{42}H_{62}O_{16}$	kristallin	Konstitutionsformel: 		

nigfaltigsten Anwendungsmöglichkeiten der Süßholzwurzel bei äußerlichem und innerlichem Gebrauche.

Heutzutage verwendet die Volksmedizin sowie die wissenschaftliche Medizin die Süßholzabkochung bzw. den eingedickten Süßholzsaft (Lakritzen, Succus) bei Erkältungskrankheiten, trockenem Husten, Lungenverschleimung, Katarrhen, Heiserkeit; speziell der Abkochung bedient man sich daneben auch bei Magen-, Leber-, Nieren- und Blasenleiden, Seitenstechen, sowie als mildes Abführmittel, letzteres bestehend aus einem Gemisch von vorzugsweise 80 % kristallinem Magnesiumsulfat und 20 % glycyrrhizinsaurem Magnesium⁹⁰.

Daraus ist ersichtlich, daß die praktische Medizin die Saponinnatur der Süßholzbestandteile auswertet. Pharmakologisch gehört nach K o b e r t⁹¹ das Süßholz zur Gruppe der Saponindrogen, deren mildest wirkendes Glied es ist. Es ist somit das mildeste und daher unschädlichste Expektorans. Da sein Geschmack zum Unterschied der meisten Saponine nicht nur kratzend, sondern der des Glycyrrhizins rein süß ist, ist es zweitens ein ausgezeichnetes nachhaltig wirkendes Geschmacks-korrigens, und dient daher als Vehikel für Arzneien. Süßholzzubereitungen sind besonders wirksame Mittel zur Verdeckung des salzigen Geschmackes. Diese Wirkung beruht auf den kolloiden Eigenschaften und der Süßkraft des Glycyrrhizins. In der Verdeckung des bitteren Geschmackes sind sie weniger wirksam und ihre Fähigkeit, den Geschmack von Alkalien zu verdecken, ist beschränkt⁹². Infolge des intensiv süßen Geschmackes ist weitgehend gereinigtes glycyrrhizinsaures Kalium ein vortreffliches Zuckerersatzmittel für Zuckerkrankte und Fettsüchtige. G a u c h m a n n⁹³ behauptet, daß durch einige Dezigramme Glycyrrhizinsalz der Geschmack gewisser Medikamente in Getränken besser korrigiert wird, als durch hundertmal größere Mengen Zucker.

Nach gewissen Autoren ist Süßholz ein berechtigter Zusatz zu harntreibenden und blasenspülenden Teegemischen. V o l l m e r & W e i d l i c h⁹⁴ fanden, daß Radix Liquiritae beim Kaninchen nur die Chlorid-Ausscheidung vermehrt, welche jedoch beim chloridarm-ernährten Tier ausbleibt. Bei Mäusen wurden Harnmenge und Chlorid-Ausscheidung gesteigert. Nach den Versuchen von V o l l m e r & H ü b n e r⁹⁵ an Ratten bietet

⁹⁰ A. P. 1976 668 vom 21. 7. 1932.

⁹¹ K o b e r t: Ber. dtseh. pharm. Ges. 25 181 (1915).

⁹² F a n t u s: J. Amer. pharm. Ass. 23 915 (1934).

⁹³ G a u c h m a n n: Ueber Glycyrrhizin und andere Pflanzensüßstoffe, Diss. d. Philos. Fakultät in Bern Berlin 1909.

⁹⁴ V o l l m e r & W e i d l i c h: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 186 574 (1937).

⁹⁵ V o l l m e r & H ü b n e r: ebenda 186 592 (1937).

die Verwendung der Radix Liquiritae als Diuretikum keine Vorteile.

Ueber die Bedeutung von Süßholzwurzelpulver als Emulgens bei der Pillenzubereitung äußert sich eingehend Sli s⁹⁶. Als Träger für Heilmittel und Geschmackstoffe findet Süßholz weiterhin in mit Wasser behandeltem, durchgeknetetem und bis zur Geruch- und Geschmacklosigkeit ausgelaugtem Zustande Verwendung. Die so erhaltenen Süßholzfasern können mit beliebigen Heilmitteln getränkt oder vermischt werden. Sie können weiter in Formen gepreßt und mit einer Ueberzugsmasse versehen werden⁹⁷.

Zum Stabilisieren von Fetten und Oelen, oder diese enthaltendes Gut, können Anteile des Süßholzwurzelharzes verwendet werden, besonders diejenigen, welche sich in Benzol, Benzin, Alkohol oder Aether lösen. Die Anwendung beziehungsweise Auflösung erfolgt zweckmäßig bei Temperaturen von etwa 70° und in Mengen von 1—4 %. So kann es z. B. verwendet werden zum Stabilisieren von Schweinefett und aetherischem Oel (z. B. Pfefferminzöl)⁹⁸.

In Rußland dienen Süßholzauszüge als Zusatzmittel zu Marmeladen, welchen sie in kleinen Mengen zugesetzt einen vollmundigen und süßen Geschmack verleihen. In England bildet Süßholz einen wichtigen Bestandteil des englischen Porter, und in Amerika einen solchen des amerikanischen Kautabaks. In Südfrankreich befindet sich unter dem Namen Coco ein mit Anisöl parfümiertes Lakritzenpulver im Handel, welches in kleinen Mengen unter gewöhnliches oder kohlen-saures Wasser gerührt, ein wohlschmeckendes und durstlöschendes, alkoholfreies Getränk liefert.

Schließlich wird Süßholz infolge seines großen Schaumvermögens als Schaummittel in Feuerlöschgeräten einerseits und andererseits als Rasiermittel, bestehend aus 12 Teilen Seife und 1 Teil Glycyrrhizin verwendet⁹⁹.

II. Pharmazeutische Zubereitungen

Mannigfaltig sind die Süßholzzubereitungen, welche in die Arzneibücher der verschiedenen Länder Aufnahme gefunden haben. Wohl die älteste und zugleich bis in die heutige Zeit hinein primitivste Zubereitung aus der Süßholzwurzel ist der Succus.

⁹⁶ Sli s : Pharm. Weekbl. 73 170 (1936).

⁹⁷ D. R. P. 710 028 Kl. 30h. vom 7. 5. 1939.

⁹⁸ A. P. 2 205 620 vom 19. 7. 1939.

⁹⁹ A. P. 1 803 076 vom 29. 9. 1928.

1) Succus Liquiritiae: Süßholzsaft

a) **Synonyma:** Lakritz, Lakritzensaft, Bärenreck, Bärenzucker, Suc oder Jus de Réglisse, Extract of liquorice, Drop, Extractum Glycyrrhizae crudum, u. a. m.

b) **Gewinnungsart:** Man kann bei der Herstellung stets 5 Phasen unterscheiden:

1. Zerkleinern der Droge
2. Extrahieren der Droge
3. Klären des Extraktes
4. Eindampfen des Extraktes
5. Ausgießen und Formen.

ad 1) Dem Zerkleinern geht das Waschen der meist ungeschälten Droge voraus. Zum kleineren Teil wird die im Herbst frisch geerntete Wurzel sogleich verarbeitet, zum größeren Teil aber dient die mehr oder weniger getrocknete Droge als Ausgangsmaterial zur Succusbereitung. Im ersteren Falle resultiert ein weicherer Succus, die Pasta grassa, aus der getrockneten Droge dagegen ein härterer Succus, die Pasta fina.

Beim Nichtwaschen des Süßholzes erhält man eine höhere Ausbeute an «Succus» mit größerem Gehalt an Wasser-Unlöslichem. Nach dem Schneiden der Wurzel folgt das Zerreiben derselben zu mehr oder weniger feinem Brei in Mühlen verschiedenen Typus.

ad 2) **Extraktionsflüssigkeit:** Die Extraktion der Wurzel geschieht überall mit Wasser. In neuerer Zeit wird enthärtetes Wasser¹⁰⁰ oder destilliertes Wasser¹⁰¹ verwendet oder aber es wird ein Zusatz von Ammoniak ($\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ %) ¹⁰⁰ empfohlen, wodurch das in Wasser schwer lösliche Calcium-Glycyrrhizinat in das leicht wasserlösliche Ammonsalz übergeführt wird und somit die Extraktionsdauer auf ein halbstündiges Kochen herabgesetzt werden kann. Nach Berg¹⁰² wird der Geschmack des Succus durch den Ammoniakzusatz nicht verändert.

Extraktionsart: Vielerorts wird die Droge über Nacht mazeriert und dann bei schwächerem oder stärkerem Feuer 1—2mal zirka 15 Stunden ausgekocht. Nach dieser rohen Methode wird der Succus auch heute noch in Italien häufig hergestellt. In Kleinasien extrahiert man die Droge zuerst

¹⁰⁰ Condorelli & Coco: Verfahren zur Extraktion von Süßholzwurzeln F. P. 627 692, ref. C I 1024 (1929).

¹⁰¹ Bertolo: Mängel in der gegenwärtigen Verarbeitung von Süßholz. Giorn. Chim. ind. et appl. 3 490 (1921).

¹⁰² Berg: Sweetening Effect of Ammonia on Fluidextract of Licorice J. Amer. pharm. Ass. 13 814 (1924).

4 Stunden und dann nochmals 2 Stunden lang. Der Extraktionsrückstand wird hierauf erneut zweimal ausgekocht und die dabei erhaltenen Extraktionsflüssigkeiten für die folgenden Extraktionen verwendet, wodurch nach *Emmanuel*¹⁰³ eine bessere Ausnützung des Gutes zustande kommen soll. In Amerika nimmt man die Extraktion unter vermindertem Dampfdruck vor¹⁰⁴. Der Extraktionsrückstand wird nochmals mit Wasser ausgezogen und das Filtrat hierauf auf 12 Bé eingedampft. Dieser konzentrierte Auszug wird als Schaummittel in den Schaumfeuerlöschapparaten verwendet.

Auspressen des extrahierten Gutes: Dies geschieht meistens mehr oder weniger sorgfältig, in Italien in primitiven Pressen (strettajo), in neuerer Zeit aber hauptsächlich in Filterpressen.

ad 3) Häufig wird die trübe Flüssigkeit gar nicht geklärt, wodurch zweifellos die Ausbeute an Succus erhöht werden kann, worunter aber die Qualität desselben wesentlich leidet. In der Regel wird die Klärung durch Dekantieren, oft aber auch durch Filtrieren vorgenommen.

ad 4) In Süditalien geschieht das Eindampfen auf primitive Art und Weise, indem die Extraktionsflüssigkeit über freiem Feuer eingedickt wird bis zum dickflüssigen Extrakt, wobei ein teilweises Anbrennen desselben nicht zu vermeiden ist. In neueren Betrieben wird das Eindampfen ausschließlich im Vakuum vorgenommen¹⁰⁵, wobei ein hellerer Succus von süßerem Geschmack erhalten wird.

ad 5) Das genügend eingedickte Produkt wird entweder in Blöcke, Brote oder Stangen ausgegossen und erstarren gelassen.

Dieser Succus des Handels ist in folgende Pharmakopöen aufgenommen worden:

Tabelle 9

Pharmakopöe	Präparat
Ph. Austriaca VIII	Extractum Liquiritiae venale Succus Liquiritiae crudus
Ph. Belgica IV	Extractum Glycyrrhizae siccum
Ph. Danica VIII	Extractum Glycyrrhizae crudum
D. A. B. 6	Succus Liquiritiae
Suom. F. VI	Extractum Glycyrrhizae crudum
Codex Gall. 6	Extractum Glycyrrhizae crudum
Ph. Helvetica V	Succus Liquiritiae
Ph. Hungarica IV	Extractum Liquiritiae venale aquosum siccum
U. S. P. XIII	Extractum Glycyrrhizae
Svenska F. 1925	Extractum Glycyrrhizae crudum Extractum Glycyrrhizae siccum

¹⁰³ *Emmanuel*: Das griechische Süßholz und dessen Succus, Festschr. Tschireh (1927).

Einige Arzneibücher enthalten daneben noch einen gereinigten Succus oder nur diesen unter der Bezeichnung Succus Liquiritiae depuratus. Tabelle 10 faßt diese Präparate zusammen, unter gleichzeitiger Angabe des Ausgangsmaterials und der Extraktionsart.

2) Extractum Liquiritiae = Succus Liquiritiae depuratus (in-spissatus). Gereinigter Süßholzsaff

a) S y n o n y m a : Extractum Glycyrrhizae
Extractum Liquiritiae depuratum aquosum subspissum u. a. m.

b) G e w i n n u n g s a r t : Entweder wird der Rohsuccus des Handels gereinigt, oder man erhält den gereinigten Süßholzsaff direkt aus den Wurzeln durch eine schonendere Aufarbeitung. Im ersteren Falle wird der Succus mit destilliertem Wasser mit oder ohne Zusatz von Ammoniak oder Chloroform ausgezogen durch wiederholte Mazeration oder Perkolation. Die vereinigten Auszüge werden einige Tage defäkieren gelassen, koliert und dann bis zur vorgeschriebenen Konsistenz eingedampft.

Tabelle 10 vermittelt einen Ueberblick dieser Präparate.

3) Succus Liquiritiae solutus

Dies stellt ein Süßholzpräparat dar, welches in den derzeitigen Arzneibüchern hauptsächlich durch den Süßholzfluidextrakt verdrängt worden ist. Die aus Succus Liquiritiae durch Perkolation mit Chloroformwasser erhaltenen Auszüge wurden bis zu einem bestimmten Trockenrückstand (zirka 45 %) eingedampft und der so erhaltene Extrakt mit Spiritus versetzt.

4) Elixir e Succo Liquiritiae = Brustelixir

a) S y n o n y m a : Elixir pectorale, Elixir regis Daniae, Elixir Ringelmannii, u. a. m.

b) H e r s t e l l u n g : Durch Lösen des Succus im Fenchelwasser und Hinzufügen von Ammoniakflüssigkeit, erhält man nach geraumem Defäkieren eine Lösung, die mit einer weingeistigen Lösung von Anisöl versetzt wird. Nach erneuter Defäkation wird filtriert. Dieses Präparat ist in folgende Arzneibücher mit wechselnder Menge der einzelnen Zusätze aufgenommen worden: (Tabelle 11)

¹⁰⁴ und ¹⁰⁵ Houseman & Lacey: Ind. Engng. Chem. 21 915 (1929)
ref. Pharm. Yearb. 64 38 (1929).

Tabelle 10

Pharmakopöe	Präparat	Ausgangsmaterial	Extraktionsart
Ph. Austriaca VIII	Extractum Liquiritiae	Radix Liquiritiae	Mazeration mit Wasser (12 Stunden) hierauf Extraktion mit kochendem Wasser (1 Stunde)
Brit. Ph. 1932	Extractum Glycyrrhizae	Radix Liquiritiae (ungeschält)	Perkolation mit Chloroformwasser
Ph. Danica VIII	Extractum Glycyrrhizae	Extractum Glycyrrhizae crudum	Wiederholte Mazeration mit ammoniakhaltigem Wasser
D. A. B. 6	Succus Liquiritiae depuratus	Succus Liquiritiae	Mazeration mit Wasser
Suom. F. VI	Extractum Glycyrrhizae	Extractum Glycyrrhizae crudum	
Codex Gall. 6	Extractum Glycyrrhizae	Radix Liquiritiae	2malige Mazeration mit ammoniakhaltigem Wasser
Ph. Hungarica IV	Extractum Liquiritiae depuratum aquosum subspissum	Extractum Liquiritiae venale aquosum siccum	Perkolation mit Wasser
F. Port. 1935	Extractum Glycyrrhizae	Radix Liquiritiae	2malige Mazeration mit 0,5 % Chloroformwasser
U. S. P. XIII	Extractum Glycyrrhizae purum	Radix Liquiritiae pulvis	Perkolation mit ammoniakhaltigem Wasser
Svenska F. 1925	Extractum Glycyrrhizae	Extractum Glycyrrhizae siccum	Mazeration mit Wasser

Tabelle 11

Bestandteile	Ph. Helv. V	D. A. B. 6
Succus Liquiritiae depuratus	—	20
Extractum Liquiritiae fluidum	40	—
Aqua Foeniculi	40	—
Oleum Foeniculi	—	0,5
Oleum Anisi (stellati)	0,1	0,5
Ammonium hydricum solutum	4	3
Spiritus	16	16
Aqua	—	60

5) Elixir Glycyrrhizae = Elixir adjuvans

Dieses Elixir war noch in der U. S. P. XI aufgeführt. Es bestand in einer Mischung von Süßholzfluidextrakt mit aromatischem Elixir. Heutzutage ist es in keiner Pharmakopöe mehr anzutreffen.

6) Extractum Liquiritiae fluidum = Süßholzfluidextrakt

a) S y n o n y m a : Fluidextract of Glycyrrhiza
 Extrait fluide de réglisse
 Extractum Glycyrrhizae fluidum u. a. m.

b) G e w i n n u n g s a r t : Die verschiedenen Herstellungsarten sind aus folgender Zusammenstellung ersichtlich:

Tabelle 12

Pharmakopöe	Präparat	Ausgangsmaterial	Extraktionsart	Aufarbeitung
Ph. Belgica IV	Extractum fluidum Glycyrrhizae	Radix Liquiritiae geschält	Perkolation mit 30 %igem Spiritus	Vor- u. Nachlauf. Nachlauf zur Trockne eindampfen und im Vorlauf lösen
Brit. Ph. 1932	Extractum Glycyrrhizae liquidum	Radix Liquiritiae pulvis ungeschält	Perkolation mit Chloroformwasser	Nach Eindampfen der Perkolate Zusatz von 90 %igem Alkohol
Ph. Helvetica V	Extractum Liquiritiae fluidum	Radix Liquiritiae (II) geschält	Mazeration mit NH ₃ -haltigem Wasser, dann Mazeration mit Wasser	Nach Zusatz von Spiritus zum alkalisch gemachten Auszug auf 45 % Trockenrückstand abdampfen und Zufügen von 10 % Spiritus
U. S. P. XIII	Fluidextract Glycyrrhizae	Radix Liquiritiae pulvis geschält oder ungeschält	Perkolation mit NH ₃ -haltigem Wasser	Aus 1000 g Droge werden nach Eindampfen 750 g Perkolat gewonnen u. mit Alkohol auf 1000 g ergänzt
Svenska F XI	Extractum fluidum Glycyrrhizae	Radix Liquiritiae (10) geschält	Perkolation mit NH ₃ - u. C ₂ H ₅ OH-haltigem Wasser	Aus 1000 g Droge werden 1000 g Fluidextrakt mit einem Trockenrückstand von mindestens 25 % bereitet.

7) Sirupus Liquiritiae = Sirupus Glycyrrhizae = Süßholzsirup

Die folgende tabellarische Zusammenstellung vermittelt einen Ueberblick über die Ausgangsmaterialien, Extraktionsarten, und Zubereitung des Süßholzsirups.

Tabelle 13

Pharmakopöe	Präparat	Ausgangsmaterial	Extraktionsart	Zubereitung
D. A. B. 6	Sirupus Liquiritiae	Radix Liquiritiae	Mazeration mit NH ₃ -haltigem Wasser	Nach Eindampfen mit Spiritus versetzen, filtrieren u. Sirupus simplex zusetzen
Suom. F. VI	Sirupus Glycyrrhizae	Radix Glycyrrhizae	Mazeration mit NH ₃ -haltigem Wasser	Mazerat eindampfen, filtrieren und Zusätze machen
Ph. Helv. V	Sirupus Liquiritiae	Extractum Liquiritiae fluidum	————	Einfache Mischung mit Sirupus simplex
Ph. Hung. IV	Sirupus Liquiritiae	Extractum Liquiritiae depuratum	————	Einfache Mischung mit Sirupus simplex
U. S. P. XIII	Sirupus Glycyrrhizae	Fluidextract Glycyrrhizae	————	Mischung desselben mit Fenchel- und Anisöl und Sirupus simplex
Svenska F. 1925	Sirupus Glycyrrhizae	Extractum fluidum Glycyrrhizae	————	Einfache Mischung mit Sirupus simplex

Daneben wird Süßholz in Form irgend eines der obigen Präparate zu den mannigfaltigsten Arzneizubereitungen, wie Tabletten, Pulver, Pillen, Teemischungen u. a. m. verarbeitet, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann.

8) Glycyrrhizinum ammoniacale

- a) Synonyma : Glycyrrhizinum ammoniatum
 Glycina
 Glycyrrhizine ammoniacale
 Ammoniated Glycyrrhizin

b) Gewinnungsart:

1. Extraktion der Droge durch Perkolation oder Mazeration mit oder ohne Alkali-Zusatz.

2. Fällung von stark mit Ballast- und Nebenstoffen verunreinigter Glycyrrhizinsäure aus dem Perkolat mittels Säuren.

3. Auswaschen des Niederschlages mit Wasser.

4. Reinigung des Niederschlages durch nochmaliges Lösen in Ammoniak, erneutes Fällern mit Säure und Auswaschen der Fällung mit Wasser.

5. Lösen der Fällung in verdünntem Ammoniak und Eintrocknen der Lösung auf Glasplatten.

In den derzeitigen Pharmakopöen ist dieses Präparat nicht mehr aufgeführt. Da es aber bei der Herstellung der reinen Glycyrrhizinsäure und ihrer Salze ein wichtiges Ausgangs- oder Zwischenprodukt bildet, sei es an dieser Stelle erwähnt. Im praktischen Teil dieser Arbeit wird näher darauf eingegangen werden.

9) Pasta Liquiritiae

Die Ph. Austriaca VIII enthält:

a) Pasta Liquiritiae flava, welche aus 94 T. frisch bereiteter Gummipaste, 5 T. Süßholzextrakt und 1 T. Vanillezucker besteht. Diese Bestandteile werden zu einem Brei angerührt, den man in Tafeln schneidet und trocknet.

b) Pasta Liquiritiae pellucida.

Aus Süßholzwurzeln wird mit Wasser ein Infus hergestellt, kolfiert und in der Kolatur Akaziengummi und Zucker gelöst. Das Ganze wird mit Orangenblütenwasser aromatisiert.

In der Ph. Gallica VI figurieren zwei Süßholzpasten unter den Namen:

a) Pasta Glycyrrhizae officinalis = Pâte de Réglisse officinale mit folgender Zusammensetzung:

Gummi arabicum	500 g
Saccharum	400 g
Succus Liquiritiae	40 g
Extractum Opii	0,2 g
Aqua destillata	600 g

b) *Pasta Glycyrrhizae composita* = Pâte de Réglisse au Goudron et au Baume de Tolu mit folgender Zusammensetzung:

Gummi arabicum	500	g
Saccharum	400	g
Succus Liquiritiae	50	g
Pix liquida	0,5	g
Tinctura Balsami tolutani	10	g
Extractum Opii	0,2	g
Aqua destillata	600	g

10) *Pulvis Liquiritiae compositus* = Brustpulver

a) *Synonyma*: Compound Powder of Liquorice
(of Glycyrrhiza)
Poudre de Réglisse composée
Pulvis pectoralis Kurellae

b) *Herstellung*: Brustpulver besteht aus einer einfachen Mischung verschiedener Drogenpulver, die in folgender Zusammensetzung in die einzelnen Pharmakopöen aufgenommen worden sind:

Tabelle 14

Pharmakopöe	Fruct.	Ol.	Sulf.	Fol.	Rad. Liq.	Sacchar.
	Foenic.	Foenic.	praec.	Sennae		
Ph. Austr. VIII	—	1	10	20	20	49
Ph. Belg. IV	10	—	10	15	15	50
Brit. Ph. 1932	8	—	8	16	16	52
Ph. Danic. VIII	7,5	—	7,5	17,5	17,5	50
D. A. B. 6	10	—	10	15	15	50
Suom. F. VI	10	—	10	20	20	40
Codex Gall. VI	10	—	10	15	15	50
Ph. Helv. V	10	—	5	20	20	45
Ph. Hung. IV	—	1	10	20	20	49
Svensk. F. 1925	10	—	10	20	20	40 (lactis)

C. SPEZIELLER TEIL

I. Arbeitsplan: Beabsichtigte Untersuchungen

Nachstehende Untersuchungen sollen zur Abklärung folgender Fragen beitragen:

1. Die Verarbeitung desselben Ausgangsmaterials zum Präparate Glycyrrhizinum ammoniacale durch Ausziehen der Droge mit Wasser, mit und ohne Zusätze, soll Aufschluß geben über das geeignetste Extraktionsmittel. Die Prüfung der verschiedenen Sorten von Glycyrrhizinum ammoniacale hat weiterhin vor allem den Zweck, diejenige Methode aufzufinden, welche das an Glycyrrhizinsäure gehaltsreichste Produkt in möglichst großer Ausbeute liefert.

2. Aus der Süßholzzubereitung Glycyrrhizinum ammoniacale soll analysenreines, primäres Ammoniumglycyrrhizinat hergestellt werden. Dieses Salz hat in erster Linie als Reinsubstanz zur Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode für Glycyrrhizinsäure zu dienen, welche auf der kolorimetrischen Ermittlung des Aglukons beruht.

3. Auf Grund der erzielten Ergebnisse der Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen mit Reinsubstanz soll ein Verfahren ausgearbeitet werden, welches auch auf die Süßholzwurzel und auf das daraus hergestellte Glycyrrhizinum ammoniacale angewendet werden kann.

4. Es ist zu untersuchen, ob das reine Ammoniumglycyrrhizinat imstande ist, die von der Süßholzwurzel gegebene Fluorescenz-Reaktion zu verursachen.

II. Isolierung, Identifizierung und Reinigung des Glycyrrhizins in Form des primären Ammoniumsalzes

1. Charakteristik des Drogen-Ausgangsmaterials

Um die Prüfungsergebnisse der einzelnen hergestellten Präparate miteinander vergleichen zu können, wurde auf die Verarbeitung von möglichst einheitlichem Ausgangsmaterial Wert gelegt. Als solches diente eine von der Firma vorm. B. Siegfried A.G., Zofingen, als ungeschältes Süßholz bezogene Droge türkischer Provenienz. Ueber die genauere Herkunft konnten keine näheren Angaben erhalten werden.

a) Untersuchungsverfahren:

a) Bestimmung des Aschengehaltes der Droge:

nach Vorschrift der Ph. Helv. V, p. 28.

β) Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes der Droge:

nach Vorschrift der Ph. Helv. V, p. 27.

γ) Bestimmung des Extraktivstoffgehaltes der Droge mit Wasser:

10 g Droge Sieb IV werden in einem Rundkolben von 250 ccm Inhalt mit 100 g dest. Wasser versetzt, $\frac{1}{4}$ Stunde unter öfterem Schütteln mazeriert und hierauf $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf dem Wasserbade am Rückflußkühler extrahiert. Nach dem Erkalten fügt man soviel Wasser hinzu, daß das Gesamtgewicht 110 g beträgt, mischt gut durch und filtriert. Mit je 11 g des Filtrates (= 1,0 g Droge) wird der Trockenrückstand nach Ph. Helv. V, p. 27 bestimmt. Das Gewicht des Trockenrückstandes mit 100 multipliziert ergibt den Extraktivstoffgehalt der Droge in Prozenten.

δ) Bestimmung des Extraktivstoffgehaltes der Droge mit Methylalkohol:

10 g Droge Sieb IV werden in einen Rundkolben von 250 ccm Inhalt gebracht, welcher mit einem Rückflußkühler verschlossen ist. Das Wurzelpulver versetzt man mit 100 g Methylalkohol. Hierauf wird auf dem Wasserbade bis zum Sieden erhitzt und letzteres $\frac{1}{2}$ Stunde aufrecht erhalten. Nach vollständigem Erkalten am Rückflußkühler wird das Gewicht des Drogenrückstandes + Auszuges mit Methylalkohol auf 110 g ergänzt und filtriert. Mit je 11 g des Filtrates (= 1,0 g Droge) wird der Trockenrückstand nach Ph. Helv. V, p. 27 bestimmt. Das Gewicht des Trockenrückstandes mit 100 multipliziert ergibt den prozentualen Extraktivstoffgehalt der Droge.

e) Bestimmung des Extraktivstoffgehaltes der Droge mit Aethylalkohol:

analog nach den Angaben bei der Bestimmung mit Methylalkohol.

ζ) Bestimmung des Saponingehaltes der Droge mit:

aa) der Schaumringprobe: nach Vorschrift der Ph. Helv. V, p. 773.

bb) der Hämolyse:

I. Qualitativer Nachweis mit Hilfe der Blutgelatinemethode nach Kofler¹⁰⁶ und Jaretsky¹⁰⁷ welche wir wie folgt modifiziert haben:

1) Phosphat-Pufferlösung von pH ca. 7,4.

2) Gepufferte Blutgelatinelösung.

3) Filtrierpapierstreifen mit Cholesterinschranke.

ad 1) Darstellung: Ca. 17 g entwässertes sekundäres Natriumphosphat werden bei 103–105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. 16 g des getrockneten Salzes und 4,4 g primäres Natriumphosphat werden im Meßkolben in Wasser zu 1 Liter gelöst.

Prüfung: Die durch 1 Tropfen Bromthymolblau in 1 ccm Phosphat-Pufferlösung erzeugte Blaufärbung muß nach Zusatz von 2 Tropfen 0,1 n-Salzsäure in eine Grünfärbung übergehen.

ad 2) Darstellung: 3,5 g Gelatine werden in 50 ccm Phosphat-Pufferlösung von pH ca. 7,4 bei höchstens 55° gelöst. In weiteren 50 ccm Phosphatpufferlösung löst man 0,05 g Nipazol und 0,02 g Kaliumcyanid, vereinigt die noch warmen Lösungen und läßt die Mischung über Nacht stehen. Ein eventuell auftretender Niederschlag wird nach Verflüssigung der Mischung durch Filtration entfernt. Die auf diese Art geklärte Gelatinelösung wird dann zu je 40,0 g in gereinigte Weithalsgläser mit Glasstopfen gefüllt und kühl aufbewahrt. Zur Herstellung der Blutgelatinelösung werden je 10 ccm der gepufferten Gelatinelösung mit je 0,5 ccm Zitratblut (siehe unten) versetzt.

ad 3) Auf 5–10 cm lange und 1/2–1 cm breite Filtrierpapierstreifen wird zirka 2 cm vom unteren Ende entfernt eine gesättigte Lösung von Cholesterin in 96 %igem Alkohol aufgetropft und der Alkohol verdunsten gelassen, sodaß der Streifen an dieser Stelle mit Cholesterin imprägniert ist.

Ausführung des qualitativen Saponinnachweises:

«0,5 g Droge (Sieb IV) werden 6 Stunden lang mit 50 ccm Phosphatpufferlösung mazeriert, wobei das Mazerat nach 2 Stunden 5mal umgeschwenkt wurde. Hierauf wird der Auszug durch ein Papierfilter filtriert und je 10 ccm Filtrat in 3 kleine Meßzylinder von entsprechend gewählter Größe gegeben. Alle 3 Meßzylinder werden mit einer Korkscheibe verschlossen, welche, in einer Spalte eingeklemmt, die in den Auszug hängenden Filtrierpapierstreifen trägt. In den einen

¹⁰⁶ Kofler: Arch. Pharm. 267 685 (1929).

¹⁰⁷ Jaretsky: Arch. Pharm. 277 45 (1939).

Meßzylinder ragt ein gewöhnlicher Filtrierpapierstreifen, in die beiden andern ein solcher mit Cholesterinschranke. Während 12 Stunden läßt man die Flüssigkeit in den Streifen kapillarisieren. Alsdann wird der Streifen ohne Cholesterinschranke getrocknet und in eine zirka 3 mm dick gegossene Blutgelatinelösung eingelegt.

Die beiden Streifen mit Cholesterinschranke werden gut mit Wasser zirka 10 Minuten lang gewaschen, um alles nicht als unlösliches Saponincholesterid gebundenes Saponin, sowie die andern wasserlöslichen Stoffe zu entfernen, und danach getrocknet. Der eine der beiden Streifen wird dann wie oben in Blutgelatine eingelegt. Der andere Streifen mit Cholesterinschranke wird zusammengerollt und in einem mit langem Steigrohr verschlossenen Reagensglas während 2 Stunden in Xylol gekocht, wodurch das Cholesterin herausgelöst wird und das Saponin auf dem Streifen verbleibt. Nach gründlichem Auswaschen des Streifens mit Aether, was die Entfernung des Xylols bezweckt, wird der Streifen getrocknet und wie oben in Blutgelatine eingelegt.»

Beurteilung des Saponinnachweises:

Liegt ein hämolysierendes Saponin vor, so muß der Streifen ohne Cholesterinschranke in der Blutgelatine eine Hämolysse bewirken. Dies ist jedoch noch kein zwingender Beweis dafür, daß ein hämolysierendes Saponin vorliegt; denn die Hämolysse kann auch durch andere Stoffe hervorgerufen werden. Der Streifen mit Cholesterinschranke ohne Xylolbehandlung keine Hämolysse zeigen, da das an Cholesterin gebundene Saponin hämolysstisch unwirksam ist.

Der Streifen mit Cholesterinschranke und Xylolbehandlung eine Hämolysse hervorrufen. Die dabei auftretende Hämolysse darf als spezifische Saponinwirkung angesehen werden.

Die Blutgelatinemethode läßt sich nach Fischer & Berthold¹⁰⁸ auch quantitativ auswerten. Davon wurde im Rahmen unserer Untersuchungen kein Gebrauch gemacht, da bereits der qualitative Nachweis in den meisten Fällen negativ ausfiel.

Für den quantitativen Nachweis der Saponine bedienen wir uns vielmehr der Bestimmungsvorschrift des hämolysischen Index.

II. Quantitativer Nachweis: Durch Bestimmung des hämolysischen Index nach der Methode, welche in das Supplementum secundum der Ph. Helv. V. aufgenommen wird.

cc) den chemischen Bestimmungsmethoden:

Glycyrrhizinsäure-Bestimmungsmethode nach:

Houseman: Gravimetrische Methode¹⁰⁹

Cederberg: Titrimetrische Methode¹¹⁰

¹⁰⁸ Fischer & Berthold: Pharm. Presse 38, Wissenschaftlich-prakt. Hefte 113 (1933).

¹⁰⁹ Houseman: Amer. J. Pharm., 84 531 (1912).

¹¹⁰ Cederberg: Svensk Farm. Tidskrift No. 20 (1927); ref.: Dtsch. Apoth. Ztg. 42 1131 (1927).

Fuchs : Süßwertmethode ¹¹¹
 Eriksson : Bestimmung des Reduktionsvermögens ¹¹²
 Eder & Sack : Gravimetrische Methode ¹¹³
 Fuchs : Kolorimetrische Methode ¹¹⁴
 Eigene, gravimetrische Methode ¹¹⁵
 Eigene, kolorimetrische Methode ¹¹⁶

b) Prüfungsergebnisse:

Tabelle 15

Untersuchung	Einzel-Bestimmungen			Mittel
Asche in %	5,72	5,50	5,83	5,68
in HCl unlösliche				
Asche in %	1,17	0,90	1,10	1,05
Feuchtigkeit in %	8,57	8,62	8,65	8,61
Extraktivstoffe				
in Wasser in %	36,10	36,20	35,80	36,00
Extraktivstoffe in				
Methanol in %	22,83	23,26	23,21	23,10
Extraktivstoffe in				
Aethanol in %	20,14	20,19	20,10	20,14
Schaumring- Methode				
Ph. Helv. V.	Pharmakopoe-gemäß			
qualitativer				
Nachweis	Keine Hämolyse			
quantitativer				
Nachweis	Keine Hämolyse			

Tabelle 16

**Glycyrrhizinsäuregehalt der Ausgangsdroge
nach verschiedenen Methoden**

Untersuchungsverfahren nach:	Glycyrrhizinsäuregehalt in %			Mittel
	Einzelbestimmungen			
Houseman	11,6	10,4	13,1	11,7
Cederberg	12,4	13,4	15,0	13,6
Eriksson	16,1	17,0		16,5
Eder & Sack	9,8	10,5	13,3	
	7,8			10,4
Fuchs	8,4	9,0		8,7
Eigene gravimetrische	9,3	9,4	9,6	
Methode	9,4	9,5	9,7	9,5
Eigene kolorimetrische	9,2	9,2	9,4	
Methode	9,2	9,3	9,4	9,3

¹¹¹ Fuchs : Scientia Pharm. 8 57 (1937).

¹¹² Eriksson : Arch. Pharm. 249 144 (1911).

¹¹³ Eder & Sack : Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

¹¹⁴ Fuchs : Scientia Pharm. 15 10 (1947).

¹¹⁵ Seite: 101.

¹¹⁶ Seite: 102.

2. Studium der Extraktionsmöglichkeiten der Droge

a) Vorschriften der Arzneibücher und einschlägige Literaturarbeiten

Keines der derzeitigen, offiziellen Arzneibücher kennt die pharmazeutische Zubereitung Glycyrrhizinum ammoniacale. Um die Jahrhundertwende hatte sie freilich in der amerikanischen und in der französischen Pharmokapöe Aufnahme gefunden. Die diesbezüglichen Darstellungsvorschriften werden unten in Tabelle 17, welche sich mit den Vergleichen der Succus- & Süßholzfluidextrakt-Herstellung befaßt, wiedergegeben.

In der Literatur begegnet man jedoch öfters diesem Produkt, das auch kurzweg Glycyrrhizin des Handels benannt wird. Vorzugsweise wird es als Ausgangsmaterial zur Herstellung von reiner Glycyrrhizinsäure und deren Salzen verwendet.

Am eingehendsten befaßte sich Bertolo¹¹⁷ mit der Darstellung des Handelsglycyrrhizins. Nach ihm stellt das Glycyrrhizinum ammoniacale kein chemisch einheitliches Produkt dar. Es besteht vielmehr aus einem Gemisch von neutralem Ammoniumglycyrrhizinat, von Glycyrrhizinbitter $C_{36}H_{57}NO_{13}$, einer amorphen, fast wasserunlöslichen, stickstoffhaltigen Substanz, sowie von dunklen Harzen, welche sich mit alkalischer Reaktion in Alkohol lösen. Der mengenmäßige Anteil der einzelnen Bestandteile soll sehr stark von der gewählten Darstellungsvorschrift abhängen. Bertolo¹¹⁷ untersuchte mehrere Sorten von Handelsglycyrrhizin.

Er gibt nach kritischer Beurteilung derselben folgende Darstellungsvorschrift:

«Die Süßholzwurzeln werden kochend mit destilliertem Wasser extrahiert. Nach Konzentrierung des wäßrigen Wurzelaustruges bis 12 Bé. wird daraus durch Zusatz von 20 g Salzsäure (Dichte 1,19) auf 1 Liter Flüssigkeit die Glycyrrhizinsäure gefällt, wobei die Salzsäure mit 2 Volumen Wasser verdünnt in der Kälte zum Auszug zugesetzt werden soll. Die Fällung wird über Nacht stehen gelassen, hierauf dekantiert, kolliert und mit dest. Wasser gewaschen, bis das Waschwasser neutral reagiert. Nach Lösung des Niederschlages in 30 ccm 30 % Ammoniak wird die Lösung bis zur Extraktstärke konzentriert, hierauf mit wenig Ammoniak enthaltendem Alkohol versetzt und unterhalb 80° zur Trockne eingedampft. Auf diese Weise soll ein gut wasserlösliches Produkt von hohem Reinheitsgrad erhalten werden.»

Des weitern beschäftigte sich Bertolo¹¹⁸ mit der Trennung des Glycyrrhizins vom stickstoffhaltigen amorphen Glycyrrhizinbitter. Aeltere Reinigungsverfahren, welche die Säure über das Trikalium- und Bleisalz herstellten, sind langwierig und unökonomisch. Bertolo¹¹⁸ schlägt die Reinigung über

¹¹⁷ Bertolo: Industriale Chimica ed Applicata 5 497—98 (1923) & 7 404 (1925).

¹¹⁸ Bertolo: Industriale Chimica ed Applicata 7 404 (1925).

**Gegenüberstellung verschiedener Darstellungsverfahren von
Glycyrrhizinum ammoniacale, Succus Liquiritiae und Extractum Liquiritiae fluidum**

	Glycyrrhizinum ammoniacale						Succus Liquiritiae	Extractum Liquiritiae fluidum Ph. Helv. V	
	U. S. P. VIII	Codex Gal- licus 1884	Bertolo ¹¹⁹ DRP. 662 834 ¹²⁰	Verfahren 1	Verfahren 2	Verfahren 3			
Ausgangs- Material	1000,0 g Droge, Sieb 20	1000,0 g Droge, zu feinen Fa- sern zer- stoßen	1000,0 g Droge	1000,0 g Droge «zer- kleinert»	1000,0 g Droge Sieb IV		Wurzeln und Aus- läufer	1000,0 g Droge Sieb II	
Extraktions- Flüssigkeit	NH ₃ 0,5 % dann H ₂ O dest.	H ₂ O dest.	H ₂ O dest.	NaOH 0,1 %	H ₂ O dest.	NH ₃ 0,5 % NaOH 0,1 %	enthärtetes H ₂ O	NH ₃ 0,5 % dann H ₂ O dest.	
Extraktions- Methode	Perkola- tion	Mazeration 4 Std.	Abkochung	Digestion	Mazeration 4 Std.		Auskochen in großen offenen Pfannen	Mazeration 24 Std.	
Mengen der Extraktions- Flüssigkeit	NH ₃ gleich wie Droge H ₂ O ad 1000 cem Perkolat	2 × 2000 cem	2 × 2000 cem	15 000 g	3000 cem, dann 1500 cem, dann 1000 cem		?	5000 g, dann 2500 g	
Aufarbeitung der Extraktbrühe (Reinigung)	fällen mit H ₂ SO ₄ dilutus q. s. Fällung 1 waschen mit Wasser bis neutral, lösen in NH ₃ (5 %ig)	Aufkochung Filtration	Konzentrie- rung bis 12° Bé Filtration	vollständige Ausfällung mit Mg- Salzen	Fällung der Ballaststoffe mit Magnesiumsalzen		Dekantieren bei 80° auf und Filtration	bei 80° auf und 1500 g ein- dampfen, alkalisieren, mit 500 g Spiritus ver- setzen, 48 Std. kühl defäkieren, filtrieren	
		gereinigte Extraktlösung						gereinigte Extrakt- lösung	gereinigte Extrakt- lösung
Herstellung des Endproduktes	fällen wie oben	fällen mit H ₂ SO ₄ (1,843) dilutus 1+4	fällen mit HCl dilu- tus 1 + 9 (aus conc.)	fällen mit HCl	fällen mit HCl dilutus 1 + 9 (aus conc.)		Eindampfen, Gießen in Blöcke oder Stangen	Eindampfen auf 45 % Trocken- rückstand. 90 T. dieses Extraktes + 10 T. Spiri- tus mischen	
	Fällung 2	Fällung	Fällung	Fällung	Fällung				

- 1) Lösen in möglichst wenig 5 %igem NH₃
- 2) Ausstreichen auf Platten
- 3) Trocknen bei 40°

¹¹⁹ Bertolo, Industriale Chimica ed Applicata 5, 497 (1923) und 7, 404 (1925).

¹²⁰ DRP. 662 834 Kl 30 h vom 6. 8. 35 ausg. 22. 7. 38.

das Cadmiumsalz vor. Letzteres soll im Gegensatz zu allen anderen Salzen die Entfernung des Glycyrrhizinbitters durch einfaches Auswaschen mit dest. Wasser gestatten:

«Das Cadmiumsalz erhält man durch Versetzen einer wäßrigen Lösung von Glycyrrhizinum ammoniacale mit einer solchen von Cadmiumchlorid. Die Ausfällung stellt in der Wärme eine weiche Masse dar, welche in der Kälte brüchig hart wird. Nach wiederholtem Waschen mit kochendem Wasser wird der Rückstand in Weingeist aufgenommen und in die Aufschwemmung Schwefelwasserstoff eingeleitet. Die Glycyrrhizinsäure geht in die alkoholische Lösung und kann nach Eindampfen und wiederholtem Umkristallisieren aus Essigsäure erhalten werden.»

Tabelle 17 soll die einzelnen Phasen festhalten, welche gemeinsam bei der Darstellung von Glycyrrhizinum ammoniacale, Succus Liquiritiae und Extractum Liquiritiae fluidum zu beobachten sind.

b) Eigene Vorschläge zur Darstellung von Glycyrrhizinum ammoniacale

Glycyrrhizinum ammoniacale, Succus und Süßholzfluidextrakt sind bis anhin nur mit Wasser als Extraktionsmittel mit und ohne Zusätze hergestellt worden. Unsere Untersuchungen wurden ebenfalls mit H₂O als Extraktionsmittel vorgenommen.

Bei der Darstellung der eben angeführten Präparate können im wesentlichen folgende 3 Phasen beobachtet werden:

Extraktion der Wurzel
Reinigung der Extraktbrühe
Aufarbeitung zum Endprodukt

Extraktion der Wurzel: Es wurde ein Verfahren gewählt, das ohne Anwendung höherer Temperaturen arbeitet. Dadurch sollten Zersetzungen der glykosidischen Hauptwirkstoffe möglichst vermieden werden. Um über das günstigste Extraktionsmittel Aufschluß zu erhalten, wurde unter Beibehaltung sonst gleicher Bedingungen die zu Sieb IV pulverisierte Droge wie folgt extrahiert:

	1. Verfahren	2. Verfahren	3. Verfahren
Ausgangs-Material:	Droge Sieb IV	Droge Sieb IV	Droge Sieb IV
Extraktions-Mittel:	Aqua dest.	0,5 %- Ammoniak	0,1 %- Natronlauge
Extraktions-Methode:	Wiederholte, 4stündige Mazeration	Wiederholte 4stündige Mazeration	Wiederholte 4stündige Mazeration

Bei der Auswahl dieser Extraktionsverfahren und -mittel wurden verschiedene Literaturangaben von Bertolo¹²¹, Katsuicki Ito¹²², Quant¹²³, Condorelli & Coco¹²⁴, Houseman & Lacey¹²⁵, Kaisha¹²⁶, u. a. m. berücksichtigt.

Reinigung der Extraktbrühe: Im Bestreben, eine möglichst reine Glycyrrhizinfällung zu erhalten, wurde nach den obenstehenden Literaturangaben die Extraktbrühe durch Zusatz von Magnesiumsalzen vor der Fällung gereinigt. Die amerikanische Pharmakopöe versuchte dies durch wiederholte Fällung mit Säure zu erreichen, das französische Arzneibuch dagegen durch Aufkochen und Filtration. Bei der Succus-Herstellung wird keine Reinigung angestrebt und bei der Fluidextraktbereitung erzielt man eine solche teilweise durch Defäkieren der Extraktbrühe (siehe Tabelle 17).

Aufarbeitung zum Endprodukt: Die Herstellung des Endproduktes wird bei Glycyrrhizinum ammoniacale erreicht durch Fällung der Säure aus der mehr oder weniger gereinigten Extraktbrühe, durch Lösen der Fällung in wenig verd. Ammoniak, durch Ausstreichen auf Platten und durch Trockenlassen bei ca. 40° Temperatur. Beim Succus Liquiritiae erhält man das Endprodukt durch Eindampfen der Extraktbrühe und Ausgießen in Blöcke oder Stangen, während beim Süßholzfluidextrakt das Eindampfen nur bis zu einem Trockenrückstand von 45 % vorgenommen wird.

c) Darstellung von 3 verschiedenen Sorten Glycyrrhizinum ammoniacale

Ausgangsdroge: Dazu wurde je 1 kg geschältes Süßholz verwendet. Die Verarbeitung von geschälter Droge hatte ebenfalls den Zweck, eine reinere Extraktbrühe und demzufolge daraus auch eine reinere Glycyrrhizinsäure-Fällung zu erhalten. Die Schälung des Süßholzes wurde von uns selbst vorgenommen und auf Sieb IV verarbeitet. Somit können die einzelnen Prüfungsergebnisse der aus der Süßholzwurzel mit verschiedenen Extraktionsmitteln hergestellten Präparate miteinander verglichen werden.

Extraktionsmittel: Bei der Zugabe der gleichen Menge Extraktionsmittel zu 1 kg gepulverter Droge mußte festgestellt werden, daß letztere zu einem Brei aufquoll und

¹²¹ Bertolo: Giorn. di chimica ind. ed appl. 3 490—91 (1921).

¹²² Katsuicki Ito: A. P. 1389 663 vom 5./4. 1920.

¹²³ Quant: Pharm. J. 108 282—85 & 311—14.

¹²⁴ Condorelli & Coco: F. P. 627 692 vom 18./1. 1927.

¹²⁵ Houseman & Lacey: Indin. Engng. Chem. 21 915—17.

¹²⁶ Kaisha: A. P. 2 058 019 vom 12./7. 1935 & It. P. 339 903 vom 19./7. 1935.

alle Flüssigkeit aufzog. Demzufolge wurde bei allen 3 Ansätzen die 1. Mazeration mit 3 Lt., dann mit 1,5 Lt. und schließlich mit 1 Lt. Extraktionsmittel vorgenommen. Insgesamt gelangten somit 5,5 Lt. Flüssigkeit auf 1 kg Droge zur Anwendung. Nach Vereinigung der einzelnen in der Presse abgetrennten Teilmazerate resultierten an vereinigten Preßflüssigkeiten beim:

Wasser-Extrakt	Ammoniak-Extrakt	Natronlauge-Extrakt
4,800 kg	4,925 kg	4,900 kg
dunkelbraun	dunkelgelbbraun	dunkelbraun mit gelblichem Stich

Zur gleichartigen Weiterverarbeitung wurden alle 3 Extraktbrühen mit dest. Wasser auf 5 kg ergänzt. Hier konnte schon eine auffällige Erscheinung beobachtet werden, die während der ganzen Herstellungsdauer auftrat. Beim Umgießen, Schütteln etc. bildete sich beim Wasser- und Natronlauge-Extrakt eine reichliche, langandauernde Schaumentwicklung, währenddessen beim Ammoniak-Auszug nur geringe Schaumbildung festzustellen war, die rasch wieder verschwand. Bemerkenswert ist ferner der gelbe Farbton, der in alkalischen Süßholzwurzelauszügen ganz allgemein auftritt. Letzteres wird weitgehend seine Erklärung finden bei der Besprechung des Fluoreszenz erzeugenden Stoffes in der Süßholzwurzel.

D e f ä k a t i o n : Beim Stehenlassen der 3 Extraktbrühen über Nacht setzte eine starke Niederschlagsbildung ein. Die klar filtrierte Lösung trübte sich jedoch wieder beim Stehen an der Luft. Diese Trübung konnte sehr stark beschleunigt werden durch Zusatz von Magnesiumsulfat, wodurch aber ein schlecht filtrierbarer Niederschlag entstand.

Vorversuche, die den Zweck hatten, eine möglichst vollständige Fällung der Ballaststoffe ohne Hauptwirkstoff-Verlust und einen gut filtrierbaren Niederschlag aufzufinden, ergaben, daß dies der Fall ist, wenn 100 T. Extraktbrühe mit 4 T. einer 10 %igen Magnesiumsulfatlösung und 2 T. Magnesiumoxyd versetzt werden. Der Magnesiumoxydzusatz scheint einen doppelten Vorteil aufzuweisen. In erster Linie bleibt die Reaktion der Extraktbrühe alkalisch, auch bei der Extraktion mit dest. Wasser. (Magnesiumsulfat allein würde in wäßriger Lösung sauer reagieren). Somit wird die Gefahr der Glycyrrhizinsäureausfällung bei der Entfernung der Ballaststoffe verringert. Des weitern scheint der Magnesiumoxydzusatz eine gut absorbierende Wirkung auf schlecht filtrierbare Niederschläge auszuüben. Trotz der angewandten Vorsichtsmaßregeln bereiteten die Extraktbrühen in der Folge große Schwierigkeiten bei der Filtration. Auch hier mußten in verschiedenen Versuchen die

Wege aufgesucht werden, die am schnellsten zu einer möglichst klaren Lösung führten. Dies wurde erreicht mittels Kolieren durch ein enggewobenes Baumwolltuch. Dabei braucht eine Sedimentation, wo sie nicht rasch eintritt, nicht erst abgewartet werden. Von der auf diese Weise so klar als möglich filtrierten Flüssigkeit wurden gewonnen beim:

Wasser-Extrakt	Ammoniak-Extrakt	Natronlauge-Extrakt
3,380 kg	3,875 kg	3,420 kg

Fällung: Die Fällung der Glycyrrhizinsäure wurde mit 10 %iger Salzsäure vorgenommen. Bei Zugabe der Salzsäure konnte in allen 3 Kolaturen eine starke Aufhellung der dunkelbraunen Flüssigkeit beobachtet werden unter gleichzeitiger Bildung einer sehr fein dispersen Fällung. Ein geringer weiterer Zusatz von Salzsäure läßt den Niederschlag sofort grobflockiger werden, sodaß er ziemlich rasch sedimentiert. Die überstehende Lösung ist am dunkelsten beim ammoniakalischen Auszug, was die Vermutung aufkommen läßt, daß Ammoniak in vermehrtem Maße gewisse andere Stoffe aus der Wurzel auszuziehen imstande ist¹²⁷. Die Fällung aus dem natronalkalischen Auszug setzt sich viel langsamer und unvollständiger ab, als die beiden andern. Unsere Vermutung geht dahin, daß nicht nur Ammoniak, sondern Alkalien ganz allgemein aus der Süßholzwurzel Nebenstoffe herauslösen, welche bei der Glycyrrhizinsäure-Bestimmung einen höheren Gehalt derselben vortäuschen können. — Die zur vollständigen Ausfällung von Glycyrrhizinsäure notwendigen Mengen an 10 %iger Salzsäure betragen beim:

Wasser-Extrakt	Ammoniak-Extrakt	Natronlauge-Extrakt
900 ccm	1500 ccm	1100 ccm

Auch bei der Abtrennung dieser Fällungen erwies sich das Kolieren als die beste Methode, was zugleich noch ein Auspressen des Rückstandes ermöglicht. Die vom Wasser möglichst befreite Gallerte bildete eine gelbe Masse von käsiger Beschaffenheit.

Endprodukt: Da aus der Glycyrrhizinsäure-Fällung nicht alle Flüssigkeit ausgepreßt werden konnte, wurde die Gallerte abweichend von der oben gegebenen Darstellungsvorschrift nicht in 5 %igem, sondern in möglichst wenig konzentriertem Ammoniak gelöst. Bei höchstens 40° wurde die ammoniakalische Lösung im Vakuum eingedickt, der breiige Rückstand auf Glasplatten ausgestrichen und im Trockenschrank bei ca. 40° getrocknet. Das erhaltene Endprodukt blätterte in

¹²⁷ Peyer: Pharm. Mh. 6 118 (1925).

gelbbraunen bis dunkelbraunen Schuppen ab. Die Menge an Glycyrrhizinum ammoniacale betrug beim:

Wasser-Extrakt	Ammoniak-Extrakt	Natronlauge-Extrakt
34,3 g	64,4 g	49,7 g

Aus diesen Zahlenwerten ergibt sich für die prozentuale Ausbeute an Glycyrrhizinum ammoniacale auf die Droge berechnet, für den:

Wasser-Extrakt	Ammoniak-Extrakt	Natronlauge-Extrakt
5,4 %	8,75 %	7,7 %

Zur Ueberprüfung der obigen Angaben wurden die noch aus den Sedimenten gewonnenen geringen Flüssigkeitsmengen in gleicher Weise zu Glycyrrhizinum ammoniacale verarbeitet und dabei folgende Werte erhalten; beim:

Wasser-Extrakt	Ammoniak-Extrakt	Natronlauge-Extrakt
5,0 %	8,6 %	8,1 %

Diese prozentualen Angaben bestätigen wiederum, daß mit alkalischen Extraktionsmitteln eine höhere Ausbeute an Glycyrrhizinum ammoniacale erreicht wird. Ob damit auch ein an Glycyrrhizinsäure reicheres Präparat erhalten wird, ist aus nachfolgenden Püfungen zu ersehen.

Z u s a m m e n f a s s u n g : Die bei der Darstellung von Glycyrrhizinum ammoniacale mit Hilfe verschiedener Extraktionsmittel unter Wahrung sonst gleicher Bedingungen gemachten Beobachtungen und Erfahrungen, können im wesentlichen folgendermaßen zusammengefaßt werden:

a) Bewährt hat sich eine 3fache Mazeration mit fallenden Mengen an Extraktionsmittel (3 Lt., 1,5 Lt. und 1 Lt.).

b) Vorteilhaft ist ferner eine Defäkation mit Magnesiumsulfat unter Zusatz von Magnesiumoxyd als Klärmittel (2 T. MgO + 4 T. 10 %ige MgSO₄ + 100 T. Extraktbrühe).

c) Zur Klärung der Auszüge, wie auch zur Gewinnung und Auswaschung der Glycyrrhizinsäurefällungen eignet sich am besten ein aus enggewobener Baumwolle bestehendes Koliertuch.

d) Der zur Ausfällung der Glycyrrhizinsäure benötigte Salzsäurezusatz wird zweckmäßig so bemessen, daß die Fällung eben beginnt, sich zu gröberer Flocken zusammenzuballen.

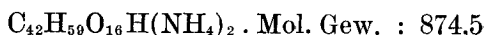
e) Als Lösungsmittel für den gallertigen Niederschlag wurde möglichst wenig konzentriertes Ammoniak verwendet.

f) Die quantitative Ausbeute an Glycyrrhizinum ammoniacale ist bei der Extraktion mit alkalischen Auszugsmitteln wie

NH₃ und NaOH rund 1,5 mal so groß, wie bei der Extraktion mit dest. Wasser ohne Zusatz. Maximale Ausbeute: ca. 8,75 % beim ammoniakal. Auszug.

d) Qualitative und quantitative Prüfung der 3 hergestellten Präparate von Glycyrrhizinum ammoniacale nebst einem gleichen aus England bezogenen Präparat

aa) **Definition:** Glycyrrhizinum ammoniacale ist ein aus Süßholzwurzel angereichertes Extraktionsprodukt, welches das Glycyrrhizin wahrscheinlich in Form des Di-Ammonsalzes enthält:



Auffallend ist die Tatsache, daß es bis anhin nicht gelang, aus der 3basischen Glycyrrhizinsäure analog zum Trikaliumsalz ein Triammonsalz herzustellen. Sämtliche Ergebnisse bezogen sich auf ein amorphes Salz, dessen Stickstoffwert einem Di-Ammonsalz entsprach¹²⁸. Schon 1879 stellte **H a b e r m a n n**¹²⁹ aus dem Mono-Ammoniumglycyrrhizinat mit überschüssigem Ammoniak ein amorphes Salz her, das einen Stickstoffwert von 3,77 % N aufwies. Er vermeinte fälschlicherweise das Tri-Ammoniumsalz in den Händen zu haben. Dies stellte sich jedoch als ein Irrtum heraus, da er der Berechnung die damals gültige, heute aber als falsch erwiesene Bruttoformel der Glycyrrhizinsäure entsprechend $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{NO}_{18}\text{H}_3$ zugrunde legte. Es scheint, daß das Di-Ammonsalz von **R i n g e l**¹²⁸ mit dem neutralen Ammonsalz von **H a b e r m a n n** identisch ist, zumal ein Tri-Ammonsalz von der heute gültigen Formel: $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}(\text{NH}_4)_3$ 4,8 % N enthalten müßte. Den Umstand, daß die 3basische Glycyrrhizinsäure imstande ist, ein Trikaliumsalz nicht aber ein Triammoniumsalz zu bilden, führt **R i n g e l** auf die verschiedene Reaktionsfähigkeit der 3 Karboxylgruppen zurück, worauf bei der Herstellung des primären Ammoniumglycyrrhizins näher eingegangen wird.

bb) **Untersuchungsverfahren:** Zur Erhöhung der Uebersichtlichkeit werden im folgenden nachstehende Abkürzungen für die untersuchten Präparate gewählt:

Glycyrrhizinum ammoniacale aus wäßr. Auszug = Gl. a. H₂O
Glycyrrhizinum ammoniacale aus NH₃-halt. Ausz. = Gl. a. NH₃
Glycyrrhizinum ammon. aus NaOH-halt. Ausz. = Gl. a. NaOH
Glycyrrhizinum ammon. aus England bezogen = Gl. a. Engl.

¹²⁸ **R i n g e l**: Zur Kenntnis des Zuckerteils des Glycyrrhizins
Diss. Breslau 11 (1939).

¹²⁹ **H a b e r m a n n**: Ann. Chem. **197** 105.

Diese vier Präparate wurden wie folgt geprüft:

- a) Aussehen.
- β) Geruch.
- γ) Geschmack.
- δ) Löslichkeit.
- ε) Reaktion der wäßrigen Lösung 1:20
qualitativ: mit Lackmus-Papier
quantitativ: mit Tena-Gerät.
- ζ) Feuchtigkeitsgehalt: nach Vorschrift der Ph. Helv. V, p. 27.
- η) Aschengehalt: nach Vorschrift der Ph. Helv. V, p. 28.
- θ) Stickstoffgehalt: Quantitative N-Bestimmung nach Kjeldahl, Modifikation von Parnas¹³⁰ und Wagner¹³¹.
- ι) Saponingehalt: qualitativer Nachweis mit Blutgelatinemethode, quantitativer Nachweis mit Bestimmung des H. I.

κ) Farbreaktionen:

qualitativer Nachweis der Glycyrrhizinsäure nach Bertolo¹³².

Löst man eine kleine Menge Substanz in 3—4 Tropfen konz. Schwefelsäure und gibt dazu einige Kristalle Vanillin, so verfärbt sich die gelbe, schwefelsaure Lösung an der Berührungsstelle in Rot-Violett. Diese Verfärbung teilt sich mit der Zeit der ganzen Flüssigkeit mit und ist längere Zeit haltbar.

qualitativer Nachweis des Liquiritins nach Shinoda¹³³.

Eine alkoholische Lösung der Substanz wird durch konz. Salzsäure und metallischem Magnesium violettrot gefärbt.

λ) Fluorescenz-Reaktion: nach Steiner¹³⁴

Ca. 1g Süßholzfluidextrakt wird in einem Scheidetrichter mit etwa 5 ccm Aether ausgeschüttelt. Der Aether-Auszug wird abgetrennt und filtriert. Davon werden einige Tropfen auf Filtrierpapier gegossen. Nach dem Verdunsten des Aethers wird der im ultravioletten Licht sehr schwach gelblich leuchtende Tüpfel mit 2—3 Tropfen einer wäßrigen, 10 %igen Kaliumboratlösung behandelt. Beim Betrachten unter der Analysenquarzlampe entsteht in einigen Sekunden eine prachtvolle, orangegelbe Fluorescenz, die auch nach dem Trocknen in un-

¹³⁰ Parnas: Z. analyt. Chem. 114 261 (1938).

¹³¹ Wagner: Z. analyt. Chem. 111 397 (1937/38).

¹³² Bertolo: Industriale Chimica ed Applicata 7 405 (1925).

¹³³ Shinoda: Ber. dtsh. chem. Ges. 67 435 (1934).

¹³⁴ Steiner: Pharm. Acta Helv. 21 364 (1946).

verminderter Stärke bestehen bleibt. Wird an Stelle einer Kaliumboratlösung Kalilauge oder Kaliumkarbonatlösung oder auch Boraxlösung verwendet, so tritt ebenfalls eine starke Fluorescenz von mehr gelblichem Farbton in Erscheinung. In bezug auf Brillanz und Leuchtkraft ist aber die mit Kaliumboratlösung hervorgerufene Fluorescenzreaktion vorzuziehen.

μ) Glycyrrhizinsäurebestimmung nach Corminboeuf¹³⁵, wie folgt präzisiert:

Ca. 2 g Glycyrrhizinum ammoniacale (genau gewogen) werden in 40 ccm Wasser bei Siedehitze gelöst und von dem darin Unlöslichen durch Filtration getrennt. Mit kleinen Mengen heißem Wasser wird das Filter wiederholt nachgewaschen, Filtrat und Waschwasser vereinigt und auf dem Wasserbade bis auf 50 ccm eingedampft. Nach der Bestimmung der in siedendem Wasser unlöslichen, organischen Substanz versetzt man das eingeeengte Filtrat mit 5 ccm n-Schwefelsäure, läßt 12 Stunden stehen und gießt die klare Flüssigkeit durch ein Filter ab. Die abgeschiedene Glycyrrhizinsäure wird möglichst durch Dekantieren mehrfach mit kleinen Mengen Wasser solange ausgewaschen, bis das Filtrat nicht mehr sauer reagiert. Hierauf wird der Rückstand in 10 %igem Ammoniak gelöst (Lösung A). Die Mutterlauge samt dem Waschwasser dampft man fast zur Trockne ein, knetet den zähen, schwarzen Rückstand dreimal mit 10, 10 und 5 ccm Wasser durch, sammelt die in Wasser unlösliche Glycyrrhizinsäure auf einem Filter und löst sie ebenfalls in 10 %igem Ammoniak. Die ammoniakalische Lösung wird mit der Lösung A vereinigt, zur Trockne eingedampft, der Rückstand bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Hierauf ermittelt man die Menge Gummi dadurch, daß man die Mutterlauge der zweiten Glycyrrhizinsäure-Abscheidung zusammen mit überschüssigem Ammoniak zur Trockne eindampft, den Rückstand bei 100° bis zum konstanten Gewicht trocknet und von dem Gewicht 0,330 g für vorhandenes Ammoniumsulfat abzieht.

ν) Glycyrrhizinsäurebestimmung nach der gravimetrischen Methode: Seite 96.

ξ) Glycyrrhizinsäurebestimmung nach der kolorimetrischen Methode: Seite 91.

cc) Prüfungsergebnisse:

Tabelle 18 **Aussehen, Geruch, Geschmack**

Substanz	Aussehen	Geruch	Geschmack
Gl. a. H ₂ O	gelbbraune Schuppen m. gelbgrünem Schimmer	fast geruchlos	stark und rein süß mit schwachem, bitterem Nachgeschmack
Gl. a. NH ₃	gelbbraune Schuppen m. gelbgrünem Schimmer	fast geruchlos	stark und rein süß mit schwachem, bitterem Nachgeschmack
Gl. a. NaOH	gelbbraune Schuppen m. gelbgrünem Schimmer	fast geruchlos	stark und rein süß mit schwachem, bitterem Nachgeschmack
Gl. a. Engl.	schwarze, glänzende Schuppen	stark nach Lakritzen	stark süß mit starkem, bitterem Nachgeschmack

¹³⁵ Corminboeuf: C 12 I 1153.

Tabelle 19

Löslichkeit in Wasser und Alkohol

0,5 g Sub- stanz in	5 ccm Wasser		10 ccm Wasser		5 ccm Alkohol
	kalt	warm	kalt	warm	warm
Gl. a. H ₂ O	trübe	trübe	wenig löslich	trübe, voll- ständig gelbgrüne Lösung	wenig löslich
Gl. a. NH ₃	trübe, un- vollständig	trübe, un- vollständig	wenig löslich	trübe, un- vollständig gelbgrüne Lösung	wenig löslich
Gl. a. NaOH	trübe	trübe	wenig löslich	trübe, voll- ständig gelbgrüne Lösung	wenig löslich
Gl. a. Engl.	fast klare Lösung	klare Lösung	wenig löslich	klare, dun- kelbraune Lösung	etwas besser löslich

Tabelle 20

Reaktion der wässrigen Lösung 1:20

Substanz	Lackmus	Elektrometrisch
Gl. a. H ₂ O	neutral	6,20
Gl. a. NH ₃	neutral	6,32
Gl. a. NaOH	neutral	6,10
Gl. a. Engl.	neutral	6,15

Tabelle 21

Feuchtigkeitsgehalt

Substanz	Feuchtigkeit in %			Durchschnitt
	I. Probe	II. Probe	III. Probe	
Gl. a. H ₂ O	7,42	7,60	7,14	7,39
Gl. a. NH ₃	9,36	10,11	10,23	9,90
Gl. a. NaOH	4,06	3,85	4,31	4,07
Gl. a. Engl.	10,04	10,36	10,33	10,24

Tabelle 22

Aschengehalt

Substanz	Aschengehalt in %			Durchschnitt
	I. Probe	II. Probe	III. Probe	
Gl. a. H ₂ O	0,58	0,57	0,55	0,57
Gl. a. NH ₃	0,56	0,50	0,53	0,53
Gl. a. NaOH	1,13	1,16	1,15	1,15
Gl. a. Engl.	2,40	2,39	2,32	2,37

Tabelle 23

Totaler Stickstoffgehalt

Substanz	Stickstoffgehalt in %			
	I. Probe	II. Probe	III. Probe	Durchschnitt
Gl. a. H ₂ O	5,92	5,88	5,95	5,91
Gl. a. NH ₃	6,78	6,82	6,89	6,81
Gl. a. NaOH	5,94	5,95	6,03	5,97
Gl. a. Engl.	4,51	4,54	4,49	4,51

Tabelle 24

Saponin-Gehalt

Substanz	qualitat. Nachweis	quantit. Nachweis
Gl. a. H ₂ O	keine Hämolyse	keine Hämolyse
Gl. a. NH ₃	keine Hämolyse	keine Hämolyse
Gl. a. NaOH	keine Hämolyse	keine Hämolyse
Gl. a. Engl.	keine Hämolyse	keine Hämolyse

Tabelle 25

Farbreaktionen und Fluoreszenzreaktion

Substanz	Glycyrrhizinsäure	Liquiritin	Fluoreszenz-Stoff
Gl. a. H ₂ O	positiv	positiv	positiv
Gl. a. NH ₃	positiv	positiv	positiv
Gl. a. NaOH	positiv	positiv	positiv
Gl. a. Engl.	positiv	positiv	positiv

Tabelle 26

Prüfung nach Corminboeuf

Substanz	In siedendem H ₂ O		Glycyrrhizinsäure in %
	Unlösliches in %	Gummi in %	
Gl. a. H ₂ O	2,36	11,08	73,24
Gl. a. NH ₃	9,42	9,90	70,91
Gl. a. NaOH	1,94	10,29	71,75
Gl. a. Engl.	0,83	14,55	65,93

Tabelle 27

Prüfung auf gravimetrischem und kolorimetrischem Wege

Substanz	Glycyrrhizinsäuregehalt in %	
	auf gravimetrischem Wege	auf kolorimetrischem Wege
	Mittelwert	Mittelwert
Gl. a. H ₂ O	51,6	46,2
Gl. a. NH ₃	51,0	45,0
Gl. a. NaOH	50,5	45,5
Gl. a. Engl.	27,9	25,4

dd) Beurteilung der Prüfungsergebnisse.

Am aufschlußreichsten waren bei den einzelnen Untersuchungen die Glycyrrhizinsäurebestimmungen. Die Gegenüberstellung der nach der Methode von *Corminboeuf* erhaltenen Werte und derjenigen auf gravimetrischem und kolorimetrischem Wege erzielten Resultate lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

1) Die Methode nach *Corminboeuf* zeitigt viel zu hohe Resultate. Dies ist umso weniger verwunderlich, da der Rückstand von Ammoniumglycyrrhizinat, welcher zur Wägung gelangt, dunkelbraun bis schwarz gefärbt und infolgedessen stark verunreinigt ist. Die Methode ist daher für die Bestimmung der Glycyrrhizinsäure in *Glycyrrhizinum ammoniacale* als solche abzulehnen.

2) Die gravimetrische Bestimmungsmethode der Glycyrrhizinsäure ergibt für *Glycyrrhizin* rund 20—25 % niedrigere Werte als die eben angeführte Methode nach *Corminboeuf*. Im Vergleich zu den auf kolorimetrischem Wege erhaltenen Werten liegen sie jedoch um rund 5 % höher. Dieser höhere Wert der gravimetrischen Methode ist nicht allein auf das Mitwägen der Verunreinigungen, sondern zur Hauptsache auf den Umstand zurückzuführen, daß das Aglukon nur eine halbe Stunde bei 60° und nicht eine Stunde bei 100° getrocknet wurde. Die Forderung, eine Stunde lang bei 100° zu trocknen, wurde später auch beim *Glycyrrhizinum ammoniacale* in die Prüfungsvorschrift aufgenommen.

3) Am zuverlässigsten scheinen uns die Resultate, welche die kolorimetrische Bestimmung ergab. Sämtliche Werte liegen etwas unter den auf gravimetrischem Wege ermittelten, was wohl auf eine geringe Verunreinigung des Aglukons hindeutet, welche mitgewogen wird, nicht aber von der kolorimetrischen Bestimmung erfaßt wird.

4) Vergleicht man die nach den drei verschiedenen Methoden erzielten Resultate miteinander, so sieht man, daß der Gehalt an Glycyrrhizinsäure bei allen vom *Glycyrrhizinum ammoniacale* H₂O über das *Glycyrrhizinum ammoniacale* NaOH und *Glycyrrhizinum ammoniacale* NH₃ zum *Glycyrrhizinum ammoniacale* England hin abnehmen, wobei letzteres Produkt bedeutend weniger Glycyrrhizinsäure enthält, als die von uns hergestellten Präparate.

5) Zur Ermittlung des gehaltreichsten Produktes an Glycyrrhizinsäure muß der Berechnung einmal die Ausbeute an *Glycyrrhizinum ammoniacale* und ferner der Feuchtigkeitsgehalt desselben zugrundegelegt werden, die beide aus den oben

wiedergegebenen Zusammenstellungen entnommen werden können. Es verhalten sich demnach die Mengen an Glycyrrhizinsäure in Glycyrrhizinum ammoniacale H_2O : Glycyrrhizinum ammoniacale NH_3 : Glycyrrhizinum ammoniacale $NaOH$ wie 2 : 3,1 : 2,9. Somit sind die beiden letzten Produkte beinahe gleichwertig und um rund 1,5 mal gehaltsreicher als das Glycyrrhizinum ammoniacale H_2O . Die aus der Tabelle ersichtlichen Glycyrrhizinsäurewerte in Glycyrrhizinum ammoniacale H_2O sind wohl höher, da der Berechnung das Endprodukt zugrundeliegt. Berücksichtigt man aber, daß aus dem wäßrigen Auszug die kleinste Ausbeute an Glycyrrhizinum ammoniacale erhalten wird, so ist der absolute auf die Ausgangsdroge bezogene Gehalt an Glycyrrhizinsäure beim ammoniakalischen Auszug am größten.

6) Der Zusatz von Alkalien bei der Extraktion von Süßholzwurzeln bewirkt eine höhere Ausbeute an Endprodukt mit annähernd gleichem Glycyrrhizinsäuregehalt wie bei der Extraktion mit Wasser ohne Zusatz.

7) Diese Ueberlegungen führen zu folgender Darstellungsvorschrift für Glycyrrhizinum ammoniacale:

Darstellungsvorschrift:

Radix Liquiritiae (IV)	1000 T.
Ammonium hydricum concentratum	q. s.
Aqua	5500 T.
Magnesium oxydatum	100 T.
Magnesium sulfuricum solutum (10 %)	200 T.

«1000 T. Süßholzwurzel werden mit 3000 T. Wasser, welches 0,5 % Ammoniak enthält, 24 Stunden lang mazeriert. Nach Kolieren und Auspressen wird der Rückstand ein zweites Mal mit 1500 T. und ein drittes Mal mit 1000 T. desselben Extraktionsmittels in gleicher Weise behandelt. Die einzelnen in der Presse abgetrennten Teilmazerate werden koliert und mit Wasser auf 5000 T. ergänzt. Nach Zusatz von 100 T. Magnesium oxydatum und 200 T. 10 %iger Magnesiumsulfatlösung und Stehenlassen über Nacht an einem kühlen Orte, wird der Drogenauszug durch ein aus eng gewobener Baumwolle bestehendes Koliertuch geklärt. Aus der klaren Lösung wird die Glycyrrhizinsäure durch Zusatz von 1500 cem 10 %iger Salzsäure gefällt und der Rückstand durch Kolieren und Auspressen möglichst von der Flüssigkeit getrennt. Die gallertige Fällung wird in wenig konzentriertem Ammoniak gelöst, bei höchstens 40° im Vakuum eingedickt, der breiige Rückstand auf Glasplatten ausgestrichen und bei ca. 40° im Trockenschrank getrocknet. Das Endprodukt stellt gelbbraune Schuppen dar und wird in einer Ausbeute von rund 8–10 % erhalten.

3. Herstellung von reinem, primärem Ammoniumglycyrrhizinat

a) **Allgemeines:** Die Herstellung des primären Ammoniumglycyrrhizinsates hatte den Zweck, einerseits eine Standard-

Substanz zur Ueberprüfung der Verwendbarkeit einer kolorimetrischen Glycyrrhizinsäurebestimmungsmethode zu besitzen, andererseits aber auch gleichzeitig damit Untersuchungen ausführen zu können, die weitgehend über die Natur des in der Süßholzwurzel sich befindenden, Fluoreszenz erzeugenden Stoffes Aufschluß geben. Für die Herstellung des primären Ammoniumsalzes der Glycyrrhizinsäure wurde als Ausgangsmaterial das aus England bezogene Glycyrrhizinum ammoniacale verwendet.

Wie im vorhergehenden Kapitel dieser Arbeit (S. 50) bereits dargelegt wurde, kann es sich nach Ringel¹³⁶ beim Ammoniumsalz der Glycyrrhizinsäure im Glycyrrhizinum ammoniacale nur um das Di-Ammoniumsalz handeln, was er mit der verschiedenen Reaktionsfähigkeit der 3 Säuregruppen zu erklären versuchte. Es scheint, daß nicht nur eines der 3 Carboxyle der Glycyrrhizinsäure in der Reaktionsfähigkeit bevorzugt ist, sondern daß auch die beiden andern sich darin scharf voneinander unterscheiden. So gelingt es in kaliumalkalischer Lösung alle 3 Säuregruppen zur Reaktion zu bringen, in ammoniakalischer Lösung dagegen nur noch zwei. Von einer dieser beiden letzteren Gruppen kann man leicht das Ammonium durch schwache Säuren speziell durch Eisessig abspalten, zum Unterschied von der Schwefelsäure, welche auch die zweite Ammoniumgruppe abtrennt. Berücksichtigt man diese verschiedenen Eigenschaften der einzelnen glycyrrhizinsäuren Salze und die Tatsache, daß die Natur und die Bindungsart des Disaccharids noch nicht restlos aufgeklärt sind, so kann folgendes gesagt werden:

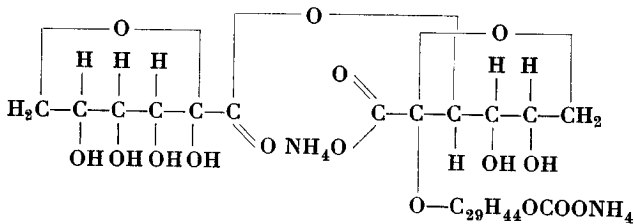
1) Bei den leicht kristallisierenden Mono-Alkalisalzen der Glycyrrhizinsäure tritt mit großer Wahrscheinlichkeit die Säuregruppe am Aglukon in Reaktion.

2) Die beiden restlichen Carboxylgruppen müssen sich ebenfalls in ihrer Reaktionsfähigkeit voneinander unterscheiden, da es nicht gelingt, analog zum Tri-Kaliumsalz, ein Tri-Ammoniumsalz der Glycyrrhizinsäure herzustellen. Auf die Frage, welche der beiden Säuregruppen nicht mehr mit Ammoniak reagiert, kann einzig die vollständige Aufklärung der Bindungsart der Zuckerkomponente im Glycyrrhizin Aufschluß geben.

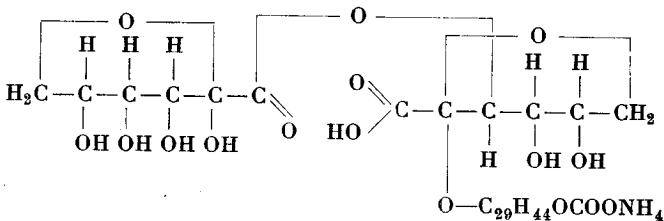
3) Auf Grund des Gesagten lassen sich folgende Konstitutionsformeln für die beiden Ammoniumsalze der Glycyrrhizinsäure entwickeln:

¹³⁶ Ringel: Zur Kenntnis des Zuckerteils des Glycyrrhizins
Diss. Breslau 11 (1939).

a) Di-Ammoniumsalz der Glycyrrhizinsäure:



b) Mono-Ammoniumsalz der Glycyrrhizinsäure:



Somit ergibt sich ohne weiteres die Darstellung des Mono-Ammoniumsalzes der Glycyrrhizinsäure aus dem Glycyrrhizinum ammoniacale: Mit Hilfe von Eisessig wird daraus eine Ammoniumgruppe abgespalten.

Die ersten zuverlässigen Angaben über die Herstellung von primärem Ammoniumglycyrrhizinat findet man bei **H a b e r m a n n**¹³⁷, dem es erstmals gelang, das Salz in kristallisiertem Zustande zu erhalten. Diese, von **B e r g m a n n**¹³⁸ verbesserte Herstellungsvorschrift lautet:

«Unter mechanischem Rühren werden in 1 Lt. siedenden Eisessig 750 g Glycyrrhizinum ammoniacale in kleinen Portionen eingetragen. Nach 5tägigem Stehen im Eisschrank zentrifugiert man aus, deckt den Bodensatz zweimal mit Eisessig ab und saugt auf einer Glasnutsche ab. Hierauf wäscht man zweimal mit Eisessig, Alkohol und Aether nach. Dann wird aus Eisessig oder besser aus etwa 80 %igem Alkohol umkristallisiert, indem man in der Siedehitze in möglichst wenig Wasser löst und 99 %igen Alkohol bis zur beginnenden Trübung hinzufügt. Behandelt man die siedend heiße Lösung mit etwas Tierkohle, so ist das Salz nach 2—3maligem Umkristallisieren analytisch rein.

Ausbeute 45 g = 6 %.

¹³⁷ **H a b e r m a n n**: Ann. Chem. 197 105 (1879).

¹³⁸ **B e r g m a n n**: Biochem. Z. 267 302 (1933).

Einige Jahre später veröffentlichten Voß, Klein & Sauer¹³⁹ ein Arbeitsverfahren, welches, unabhängig von der Qualität des Ausgangsmateriales, eine erheblich bessere Ausbeute an primärem Ammoniumglycyrrhizinat wie bisher zeitigen soll. Dieses Herstellungsverfahren lautet:

«500 g Glycyrrhizinum ammoniacale werden in 1250 cem Eisessig unter gutem Umschütteln und langsamem Erwärmen bis zum Sieden gelöst und die Lösung 3 Tage lang zur Kristallisation stehen gelassen. Der abgenutzte Kristallbrei wird erneut aus 625 cem Eisessig umgelöst. Nach dem Absaugen und Trocknen im Vakuumexsiccator über Aetzkalk und Kaliumhydroxyd werden 160 g eines hellbraunen Pulvers erhalten, die aus 96 %igem Alkohol zweimal umkristallisiert werden. (Zusatz von A-Kohle bei der 1. Kristallisation.)

Dabei werden 20 g in etwa 2,5 Lt. Alkohol heiß gelöst und die Lösung wegen der rasch einsetzenden Kristallisation durch einen Dampftrichter filtriert. Aus der ersten alkoholischen Lösung fällt das Ammoniumsalz schon in rein weißen Schuppen aus. Ausbeute: 18,4 % bezogen auf die Menge des Ausgangsmaterials, bzw. 54 %, bezogen auf den Gehalt an Glycyrrhizinsäure. Da aber das auf diese Weise erhaltene glycyrrhizinsäure Ammonium Reste von Essigsäure sehr zähe festhält, wird es zur völligen Entfernung der letzteren zweckmäßig im Soxhlet mit Aether über Natrium extrahiert.»

Leuenberger¹⁴⁰ empfiehlt ein Verfahren, das sowohl die Angaben von Bergmann wie auch diejenigen von Voß berücksichtigt:

«750 g Glycyrrhizinum ammoniacale werden in 1 Lt. siedendem Eisessig gelöst und 3—4 Tage stehen gelassen. In dem zähen, schwarzen Sirup scheidet sich ein feines Kristallpulver aus. Durch längeres, energisches Zentrifugieren werden die Kristalle von der Eisessigmutterlauge getrennt. Der Kristallbrei wird durch mehrmaliges Abdecken mit frischem Eisessig weiter gereinigt und dann aus Alkohol umkristallisiert. Man erhält etwa 130 g eines schwach gelblichen Produktes.»

Als letzte veröffentlichte Herstellungsmethode von primärem Ammoniumglycyrrhizinat sei diejenige von Ringel¹⁴¹ erwähnt, nach welcher zur Hauptsache von uns das glycyrrhizinsäure Ammonium hergestellt wurde:

«2000 g Glycyrrhizinum ammoniacale werden in 5 Lt. Eisessig unter Erwärmen bis zum beginnenden Sieden gelöst. Diese Lösung bleibt nun 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, wonach die Mutterlauge von der die ganze Lösung durchsetzenden Kristallmasse durch Zentrifugieren abgetrennt wird. Zweimal suspendiert man jetzt das noch stark verunreinigte Produkt im Zentrifugenglas mit Eisessig und zentrifugiert jedesmal wieder ab. Dadurch erzielt man eine weitgehende Reinigung, ohne daß man die Verluste in Kauf nehmen muß, die mit einer zweiten Kristallisation aus Eisessig verbunden sind. Zur Entfernung des Hauptteils der anhaftenden Essigsäure deckt man

¹³⁹ Voß, Klein & Sauer: Ber. dtsh. chem. Ges. 70 127 (1937).

¹⁴⁰ Leuenberger: Zur Kenntnis der Glycyrrhetinsäure Diss. ETH Zürich 30 (1938).

¹⁴¹ Ringel: Zur Kenntnis des Zuckerteils des Glycyrrhizins Diss. Breslau 23 (1939).

das Salz mit gewöhnlichem Alkohol ab, der ebenfalls wieder abzentrifugiert wird. Nach dem Trocknen bei 60–70° an der Luft extrahiert man das Salz zur völligen Entfernung der Essigsäure im Soxhlet mit absolutem Aether. Zum Abfangen der Säure gibt man in den Kolben des Extraktors Späne metallischen Natriums. Etwa zehnmaliges Abhebern genügt bereits, um den gewünschten Erfolg zu erzielen. Es resultiert eine fein kristalline hellgelbbraune Substanz. Ausbeute: 675 g = 33,75 %, bezogen auf das Rohprodukt.

Dieses noch unreine Ammoniumsalz wird in einzelnen Teilen zweimal aus gewöhnlichem Alkohol umkristallisiert. Je 20 g werden durch kurzes Aufkochen in 2,5–3 Lt. gelöst und das erstemal mit ungefähr 1 g aktiver Kohle entfärbt. Beim Erkalten der klaren hellgelben Lösung scheidet sich zunächst ein geringer, unansehnlicher und schmieriger Niederschlag ab, der die Kristallisation verhindert. Nach dem Abfiltrieren desselben erfolgt die kristalline Abscheidung des Salzes in entsprechender Menge. Das erneute Umkristallisieren geht glatt vonstatten. Getrocknet wird bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum über Chlorkalzium. Ausbeute: 450 g = 22,5 %, bezogen auf das Rohprodukt, bzw. 69,4 % bezogen auf den Gehalt an Glycyrrhizinsäure.»

b) Praktischer Teil:

Darstellung von primärem Ammoniumglycyrrhizinat: nach der oben gegebenen Vorschrift von Ringel, wobei folgende Beobachtungen gemacht werden konnten:

Wurden 250 g Glycyrrhizium ammoniacale in 625 ccm Eisessig nach Ringels Vorschrift gelöst, so kristallisierte wohl nach 3tägigem Stehen etwas aus. Die Menge war jedoch so gering, daß sich eine Weiteraufarbeitung gar nicht mehr lohnte. Es wurde nun versucht die Ausbeute zu erhöhen durch Wahl der Darstellungsmethoden von Bergmann und Voß. In keinem Falle konnte jedoch eine erheblich bessere Ausbeute erzielt werden. Dies gelang erst, als beim Auflösen des Glycyrrhizium ammoniacale bestimmte Maßnahmen getroffen wurden, die zum Teil auch Leuenberger befolgte. Letzterer Autor löste das Glycyrrhizium ammoniacale in siedendem Eisessig. Auch wir konnten die Beobachtung machen, daß das Glycyrrhizium ammoniacale nur kurze Zeit mit dem siedenden Eisessig in Verbindung stehen darf. Wir trugen daher die vorgeschriebene Menge Substanz in den siedend heißen Eisessig ein und stellten die Lösung hierauf gleich an die Kälte.

Auf diese Weise erhielten wir eine 30 %ige Ausbeute an Rohprodukt. Die Reinigung dieses Rohproduktes gestaltete sich in der Folge ziemlich verlustreich, da der Eisessig mit großer Hartnäckigkeit zurückgehalten wurde. An reinem Endprodukt konnten nur 18 g = 9,2 %, bezogen auf das Ausgangsmaterial, erhalten werden.

Die Analyse des Mono-Ammonium-Glycyrrhizinsates ergab nach der Trocknung der Substanz während 12 Stunden im

Hochvakuum bei 90° über Phosphorpentoxyd Werte, welche am besten auf ein primäres Ammoniumglycyrrhizinat mit 4 Kristallwasser paßten:

3,594 mg Substanz gaben 7,349 mg CO₂ und 2,552 mg H₂O
C₄₂H₆₅O₁₆N · 4H₂O : Ber. C 55,30 % H 8,06 % N 1,53%
Gef. C 55,80 % H 7,95 % N 1,36%

III. Bestimmung der Glycyrrhizinsäure

1) Die hauptsächlichsten in der Literatur beschriebenen Bestimmungsverfahren

a) Allgemeines

Um über den Wert der auf verschiedene Weise dargestellten Präparate Aufschluß zu erhalten, war eine Bestimmung des Hauptinhaltsstoffes, der Glycyrrhizinsäure, erforderlich, welche möglichst genaue Resultate zeitigte. Bislang ist dieser Inhaltsstoff allein für alle Wirkungen verantwortlich gemacht worden, auf Grund derer das Süßholz in der Therapie Verwendung findet. In neuerer Zeit ist man geneigt, etwelche therapeutische Werte auch dem Flavanonglukosid Liquiritin zuzuschreiben, von welchem an anderer Stelle noch eingehender berichtet werden soll.

Die Beurteilung der Droge, sowie der daraus dargestellten Präparate besteht daher heute noch in der möglichst genauen Ermittlung des Glycyrrhizinsäure-Gehaltes. Seit langer Zeit wurden immer wieder Versuche unternommen, Bestimmungsmethoden für die quantitative Erfassung der Glycyrrhizinsäure auszuarbeiten, jedoch mit wechselndem Erfolg. Eine Uebersicht über die verschiedenen Gehaltsbestimmungen der Glycyrrhizinsäure der älteren Literatur findet sich in der Arbeit von Linz¹⁴². Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden in neuerer Zeit von Eder & Sack¹⁴³ ausgeführt. Im folgenden wird auf die Methodik der einzelnen Verfahren zur Bestimmung der Glycyrrhizinsäure in Kürze eingegangen.

Man kann die Wertbestimmungsmethoden für das Glycyrrhizin in 2 Gruppen einteilen. Der einen Gruppe liegt die Bestimmung des Glykosides als solches oder seiner Salze zugrunde, der anderen Gruppe die Bestimmung der Hydrolyse-Spaltprodukte, speziell des Zuckerteils, wie nachstehende Aufstellungen zeigen:

¹⁴² Linz: Arch. Pharm. 254 65; 204 (1916).

¹⁴³ Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

Tabelle 28

b) Gruppe I: Ermittlung des Glycyrrhizinsäuregehaltes durch Bestimmung derselben als Glykosid

No.	Bestimmungsmethode	Bestimmungsform	Literatur
1	Gravimetrische Methode	Säure	Parry ¹⁴⁴ , Schmidt ¹⁴⁵
		Salz	Houseman ¹⁴⁶ , Linz ¹⁴⁷ , Diehl ¹⁴⁸ , Haffner ¹⁴⁹ , Capin ¹⁵⁰ u. a. m.
2	Titrimetrische Methode	Säure	Cederberg ¹⁵¹
3	Physiologische Methoden:		
	a) Süßwertmethode b) Hämolyse	Salz Säure	Fuchs ¹⁵²

e) Bemerkungen zu den einzelnen Verfahren:

ad 1) Gravimetrische Methoden:

Allen Verfahren, welche die Glycyrrhizinsäure oder deren Salze durch Wägung quantitativ bestimmen, haften zum vorneherein Fehler an, die sich auf das Resultat nachteilig auswirken. Bei den zahlreichen Versuchen, den Glykosidgehalt in der Droge oder in den Drogenpräparaten gravimetrisch zu ermitteln, wurden verschiedene Extraktionsmittel verwendet, teils ohne Vorbehandlung der Droge mit Aether oder absolutem Alkohol, teils erst nach Entfernung von störenden Begleitstoffen aus der Droge mit den genannten Lösungsmitteln. Immer wieder konnte aber die Beobachtung gemacht werden, daß das Glykosid weder quantitativ mit Säure gefällt, noch in reiner Form erhalten werden kann. Auch gelang es mit keinem Lösungsmittel, die in unreinem Zustande gefällte Säure zu reinigen, wodurch entweder das Glykosid oder die Verunreinigungen herausgelöst worden wären. Linz¹⁵³ versuchte die Glycyrrhizinsäure über verschiedene Metallsalze zu reinigen,

¹⁴⁴ Parry: The Chemist and Druggist Bd. I 26 (1910).

¹⁴⁵ Schmidt: Lehrbuch d. pharmaz. Chemie 1966 (1911).

¹⁴⁶ Houseman: Amer. J. of Pharm. 84 531 (1912).

¹⁴⁷ Linz: Arch. Pharm. 254 205 (1916).

¹⁴⁸ Diehl: Pharm. Rundschau Bd. II 31 (1883).

¹⁴⁹ Haffner: Zeitschrift des allgemeinen österreichischen Apothekervereins 542, 572, 588, 612 (1899).

¹⁵⁰ Capin: De la Glycine. Thèse de doctorat en pharmacie, Bordeaux 1911.

¹⁵¹ Cederberg: Svensk Farm. Tidskrift No. 20 (1927); ref. Dtsch. Apoth. Ztg. 42 1131 (1927).

¹⁵² Fuchs: Scientia Pharm. 8 57 (1937).

¹⁵³ Linz: Arch. Pharm. 254 204 (1916).

mußte aber feststellen, daß auch dieser Weg zu keiner reineren Glykosidfällung führte, da offenbar die Verunreinigungen selbst ebenfalls sauren Charakter haben. Es können daher alle bisherigen Verfahren, welche die gravimetrische Bestimmung des Glykosides zum Ziele hatten, in keiner Weise befriedigen.

ad 2) Titrimetrische Methode:

Im Gegensatz zu den vielen Versuchen, die Glycyrrhizinsäure gravimetrisch zu bestimmen, arbeitete Cederberg¹⁵⁴ eine Bestimmungsmethode aus, welche auf der titrimetrischen Ermittlung des Glykosidgehaltes beruhte. Wohl gelang es Cederberg dadurch ein Mitwägen der Verunreinigungen zu vermeiden, nicht aber eine Mitbestimmung derjenigen Begleitstoffe, welche sauren Charakter haben. Zudem ist auch hier die Fällung mittelst Säure nicht vollständig und damit das Verfahren in vorliegender Form als unbrauchbar zu beurteilen.

ad 3) Physiologische Methoden:

a) Süßwertmethode: Diesem Bestimmungsverfahren liegt der starke, langanhaltende, süße Geschmack der sauren Salze des Glykosides zugrunde. Zur Festlegung der Süßwahrnehmung wird die Geschmacksempfindung mit einer Saccharinlösung geeicht. Fehlerhaft ist dabei die Verwendung von Saccharin-Natrium als Standardsubstanz. Empfehlenswerter wäre die Eichung der Geschmacksempfindung zum Beispiel mit reinem kristallisiertem Monokalium-Glycyrrhizinat. Aber auch dann würden sich noch Fehlberechnungen ergeben, da das Glykosid sich in der Pflanze nicht nur als Monokaliumsalz vorfindet und die verschiedenen Salze der Glycyrrhizinsäure zudem bei weitem nicht den gleichen Süßwert aufweisen. Da dieser Methode wie jeder physiologischen Wertbestimmung überdies noch eine ziemlich große Fehlerbreite anhaftet, kann diese Gehaltsbestimmung nicht als genau bezeichnet werden.

b) Hämolyse: Nach Fuchs¹⁵⁵ kann die Glycyrrhizinsäure wegen ihrer geringen hämolytischen Wirkung auf diese Weise nicht quantitativ erfaßt werden. Die von uns mit der Droge und den Reinsubstanzen durchgeführten Versuche zeigten verschiedene Resultate, die zum Teil bei der Prüfung des Ausgangsmaterials (s. d.) angeführt wurden, zum Teil aber nachstehend bei der praktischen Durchführung der verschiedenen Bestimmungsmethoden zusammengefaßt werden. Auch beim positiven Ausfall der Hämolyse und der quantitativen Erfassung derselben, dürfte daraus nicht auf das mengenmäßige Vorliegen der Glycyrrhizinsäure geschlossen werden,

¹⁵⁴ Cederberg: Svensk Farm. Tidskrift No. 20 (1927); ref. Dtsch. Apoth. Ztg. 42 1131 (1927).

¹⁵⁵ Fuchs: Scientia Pharm. 15 4 (1947).

solange die Frage nicht restlos abgeklärt worden ist, ob neben der Glycyrrhizinsäure in der Droge nicht noch andere hämolyzierende Saponine vorkommen. Eine quantitative Auswertung mit Hilfe der Hämolyse kommt daher für diese Saponindroge gar nicht in Frage.

Tabelle 29

d) Gruppe II: Ermittlung des Glycyrrhizinsäuregehaltes durch Bestimmung der Hydrolyse-Spaltprodukte, speziell des Zuckerteils

No.	Bestimmungsmethode	Bestimmungsform	Literatur
1	Bestimmung des Reduktionsvermögens gegenüber Fehling'scher Lösung	Glukuronsäure	Eriksson ¹⁵⁶ Tschirch ¹⁵⁷
2	Hydrolyse des Glykosides mit Salzsäure und gravimetrische Bestimmung des aus Glukuronsäure gebildeten Furfurols	Furfurol als Furfurolbarbitursäure aus Glukuronsäure	Eder & Sack ¹⁵⁸
3	Kolorimetrische Methode	Glukuronsäure	Fuchs ¹⁵⁹
4	Physiologische Methode Entgiftungsmethode	Salz des Glykosids resp. Aglukon	Velluz ¹⁶⁰

e) Bemerkungen zu den einzelnen Verfahren:

ad 1) Bestimmung des Reduktionsvermögens:

Tschirch & Eriksson¹⁶¹ erhofften mit dieser Methode nicht nur den Glycyrrhizinsäure-Gehalt, sondern daneben auch noch den Gehalt an Glukose und Saccharose in der Droge ermitteln zu können. Das Verfahren ergibt keine exakten Resultate, da die Bestimmungsvorschriften mangelhaft und ungenau sind. Deshalb wird es heutzutage kaum mehr zur Glycyrrhizinsäurebestimmung verwendet.

¹⁵⁶ Eriksson: Arch. Pharm. 249 144 (1911).

¹⁵⁷ Tschirch: Handbuch der Pharmokognosie Bd. II 90.

¹⁵⁸ Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

¹⁵⁹ Fuchs: Scientia Pharm. 15 2 (1947).

¹⁶⁰ Velluz: Comptes rendus des séances de la société de biologie Bd. 111 No. 32 354 (1932); ref. Mercks Jahresbericht 46 178 (1932).

¹⁶¹ Eriksson: Arch. Pharm. 249 144 (1911).

ad2) Gravimetrische Methode nach Eder & Sack¹⁶²:

Dieses Bestimmungsverfahren beruht auf der Tatsache, daß das Glykosid durch Hydrolyse in 1 Molekül Glycyrrhetinsäure und 2 Moleküle Glukuronsäure gespalten wird und daß die Hexuronsäure bei der Destillation mit Salzsäure nach Tollens¹⁶³ quantitativ Furfurol liefert, welches als Furfurol-Barbitursäure gewichtsanalytisch bestimmt werden kann. In theoretischer Hinsicht ist an diesem Verfahren nichts auszusetzen. Bei der praktischen Ausführung ergeben sich aber verschiedene Schwierigkeiten, welche auch das Resultat recht ungünstig beeinflussen. Zudem erfordert die Bestimmung allzu viel Zeit, und wiederholt konnten wir feststellen, daß bei niedrigem Glycyrrhizinsäure-Gehalt, die Furfurollösung mit Barbitursäure nur noch eine Gelbfärbung, nicht aber einen wägbaren Niederschlag ergab.

ad3) Kolorimetrische Methode:

Die letzte, vor kurzem veröffentlichte Glycyrrhizinsäure-Bestimmungsmethode stammt von Fuchs¹⁶⁴, welcher die aus der Glycyrrhizinsäure durch Hydrolyse mit Salzsäure abgespaltene Glukuronsäure erstmals auf kolorimetrischem Wege bestimmte. Beim Ausziehen der Droge, beim Fällen der Glycyrrhizinsäure und bei der Aufspaltung derselben, wird analog zum Verfahren nach Eder & Sack¹⁶⁵ vorgegangen. In der dabei erhaltenen wäßrigen Lösung wird die Glukuronsäure mit Naphthoresorzin und konz. Salzsäure zur maximalen Farbstoffbildung gebracht, der Farbstoff nach beendeter Reaktion mit Aether ausgeschüttelt und die aetherische Farbstofflösung im Pulfrich-Photometer quantitativ bestimmt. Diese Methode erlaubt die Bestimmung mit sehr kleinen Mengen an Ausgangsmaterial durchzuführen, benötigt dazu jedoch beinahe gleich viel Zeit wie das Verfahren nach Eder & Sack¹⁶⁵. Fuchs¹⁶⁶ gelang es durch den sauren, alkoholischen Drogenauszug und die Saponinfällung mit Bleiazetat störende Begleitstoffe bei der kolorimetrischen Bestimmung auszuschalten. Es wäre aber eine Präzisierung der Farbstoffreaktion nicht bei ihrer Bildung als vielmehr bei der Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln am Platze, denn die Naphthoresorzinprobe nach Tollens¹⁶⁷ ist, wie den Ausführungen von Michael¹⁶⁸ zu ent-

¹⁶² Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

¹⁶³ Tollens: Z. physiol. Chem. 61 95 (1909), 67 138 (1910).

¹⁶⁴ Fuchs: Scientia Pharm. 15 2 (1947).

¹⁶⁵ Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

¹⁶⁶ Fuchs: Scientia Pharm. 15 10 (1947).

¹⁶⁷ Tollens: Z. physiol. Chem. 61 95 (1909), 67 138 (1910).

¹⁶⁸ Michael: Chemie der Zucker und Polysaccharide Akad. Verlagsgesellschaft M. B. H. Leipzig 61 (1939).

nehmen ist, nicht spezifisch auf Uronsäure, sondern spricht auch auf die verschiedensten Zucker an.

So geben Glukose, Mannose und Galaktose eine grün-blaue, Rhamnose eine violette, Arabinose und Xylose eine dunkelblaue Färbung. Alle diese Färbungen, die von Zuckern herrühren, lassen sich einwandfrei von der durch Uronsäuren erzeugten Farbstoffbildung unterscheiden, indem sich die Violettfärbung mit Uronsäuren im Gegensatz zu den durch die Zucker hervorgerufenen Färbungen, mit Benzol ausschütteln läßt. Es wäre daher zu untersuchen, ob nicht die Aetherausschüttelung zweckdienlicher durch eine Ausschüttelung mit Benzol zu ersetzen wäre.

ad 4) Physiologische Methode:

Entgiftungsmethode:

Velluz¹⁶⁹ Befund, daß Glycyrrhizinsäure imstande ist, Tetanus-Toxin durch Ueberführung in ein Kryptotoxin zu entgiften, ist insofern bemerkenswert, als dabei erstmals die Ermittlung des Glycyrrhizinsäure-Gehaltes auf der Bestimmung des Aglukons fußt. Die Umstände erlaubten es uns nicht, die Methode nachzuprüfen und quantitativ auszuwerten.

2) Eigene Versuche zu einer brauchbaren Bestimmungsmethode für Glycyrrhizinsäure in Radix Liquiritiae zu gelangen.

Unsere Untersuchungen verfolgten alle den gleichen Zweck: Zur Ermittlung des Glycyrrhizinsäure-Gehaltes in der Droge sollte nicht das Glykosid oder eines seiner Salze, auch nicht der Zuckeranteil, nach hydrolytischer Spaltung, sondern das Aglukon, die Glycyrrhetinsäure, zur Bestimmung herangezogen werden und zwar aus folgenden Ueberlegungen heraus:

Von dem Glykosid, der Glycyrrhizinsäure, ist wohl die elementare Zusammensetzung, nicht aber die genaue Konstitution des Moleküls bekannt. Man weiß ferner, daß das Saponin bei der Hydrolyse 1 Molekül Glycyrrhetinsäure und 2 Moleküle derselben, oder verschiedener Hexuronsäuren liefert. Die bestbekannte Komponente im Glycyrrhizinsäuremolekül ist heute unzweifelhaft das Aglukon, dank der zahlreichen Untersuchungen von Karrer¹⁷⁰, Bergmann¹⁷¹, Voß & Mitarbeiter¹⁷², Ruzicka & Leuenberger¹⁷³, Ruzicka & Co-

¹⁶⁹ Velluz: Comptes rendus des séances de la société de biologie Bd. III No. 32 354 (1932); ref.: Mercks Jahresbericht 46 178 (1932).

¹⁷⁰ Karrer: Helv. Chim. Acta 4 100 (1921).

¹⁷¹ Bergmann: Biochem. Z. 267 296 (1933).

¹⁷² Voß: Ber. dtsh. chem. Ges. 70 122 (1937).

¹⁷³ Ruzicka & Leuenberger: Helv. Chim. Acta 20 312 (1937)

hen¹⁷⁴, Ruzicka & Jeger¹⁷⁵. — Es war daher am nahe-
liegenden, das Aglukon aus dem Glykosid in möglichst reiner
Form quantitativ zu eliminieren und dieses auf irgend eine Art
zu bestimmen. Um die verschiedenen Bestimmungsarten des
Sapogenins kennen zu lernen, waren einerseits die Reinigung
des Rohsaponins, andererseits die verschiedenartigen Spaltungs-
möglichkeiten des Glykosids, sowie die Eigenschaften des Aglu-
kons, der Glycyrrhetinsäure, erforderlich.

Das Reinigen des Roh-Saponins sollte schon dafür Gewähr
bieten, eher zu einem reineren Sapogenin-Rückstand zu ge-
langen. Dieser Arbeitsgang ist aber mit großen Schwierig-
keiten verbunden, was nachstehende Erläuterungen bestätigen
sollen: Für die Reinherstellung der Saponine existiert kein
allgemein gültiges Verfahren. Es muß vielmehr für jedes Sa-
ponin das geeignete Verfahren aufgesucht und entwickelt wer-
den. Die dabei auftretenden Schwierigkeiten werden bei der
Reinigung der Saponine für die Gehaltsbestimmungen, wobei
kein Saponin verlustig gehen darf, in den meisten Fällen un-
überwindbar groß. So verunmöglichen die erschwerte Kristalli-
sation der Saponine, das kolloide Vorliegen in wäßriger Lö-
sung, das zähe Festhalten von Mineralstoffen und Pflanzen-
farbstoffen u. a. m., die Saponin-Reinigung im Rahmen einer
zuverlässigen Gehaltsbestimmung. Sehr oft kommen in der
Pflanze, und dies ist beim Süßholz in erhöhtem Maße der Fall,
neben dem Saponin noch verschiedene Zucker vor, zu deren
Beseitigung Maßnahmen erforderlich sind, welche auch die im
Saponinmolekül vorhandenen Zucker erfassen. Ferner kann
durch das Reinigungsverfahren das Saponin in seinen physika-
lischen und physiologischen Eigenschaften stark verändert
werden, was eine Saponinbestimmung mit Hilfe der Hämolyse
verunmöglicht. Wir versuchten die rohe Glycyrrhizinsäure-
fällung wie folgt zu reinigen:

a) Cholesterinmethode¹⁷⁶: Bekanntlich sind viele
Saponine imstande mit Cholesterin Additionsverbindungen ein-
zugehen, welche in Wasser, Aceton und Aether unlöslich sind.
Dieser Verbindung kann durch siedendes Xylol das Cholesterin
wieder vollständig entzogen werden.

Beim qualitativen Nachweis des Glycyrrhizins in der Droge
mit Hilfe der Blutgelatinemethode bedienen wir uns dieser
Tatsache. In den zahlreichen, ausgeführten Versuchen gelang
es uns in keinem Falle selbst mit diesem empfindlichen Ver-
fahren, eine Hämolyse im Bereiche der Cholesterinschranke
nachzuweisen. Auch beim Versetzen einer alkoholischen Lö-

¹⁷⁴ Ruzicka & Cohen: *Helv. Chim. Acta* **20** 804 (1937).

¹⁷⁵ Ruzicka & Jeger: *Helv. Chim. Acta* **25** 775 (1942); **26** I 265
(1943) **26** 2278 (1943).

¹⁷⁶ Kofler: *Die Saponine* Verlag Springer Wien 57 (1927).

sung von reinem Ammoniumglycyrrhizinat mit einer solchen von Cholesterin in Alkohol in der Siedehitze konnte keine Fällung erhalten werden. Es scheint, daß mit dieser Methode keine Reinigung der Glycyrrhizinsäure möglich ist.

β) Fällung mit Tannin¹⁷⁷: Bei der Herstellung des Glycyrrhizinum ammoniacale wurde von uns schon versucht, den Drogenauszug mit Gerbsäure zu reinigen. Dies führte aber zu keiner reineren Saponinfällung mit Salzsäure. Versuche, aus Lösungen von reinem Ammoniumglycyrrhizinat in Wasser das Saponin durch Zusatz von Gerbsäurelösung auszufällen, verliefen ebenfalls erfolglos.

γ) Bleimethode¹⁷⁸: Salze der Glycyrrhizinsäure in wäßriger Lösung geben sowohl mit neutralem, wie mit basischem Bleiazetat starke Fällungen, welche aber aus Drogenauszügen ziemlich gefärbt erhalten werden. Dieser Methode bedienten sich zur Eliminierung unerwünschter Begleitstoffe und zur quantitativen Fällung des Glycyrrhizins Eder & Sack¹⁷⁹ und neuerdings auch Fuchs¹⁸⁰. Kofler¹⁸¹ weist darauf hin, daß die Bleimethode zur Reinigung bei der quantitativen Bestimmung der Saponine unbrauchbar ist, da durch die Bleifällung die hämolytische Wirkung der Saponine stark geschwächt wird.

Für unsere Versuche, die alle eine chemische Bestimmung des Saponins zum Ziele hatten, ist dieser Einwand nicht stichhaltig. Deshalb verwendeten wir, wie obige Autoren, zur Reinigung und zur quantitativen Fällung des Saponins neutrales Bleiazetat.

Die Aufspaltung der Saponine in das Sapogenin und den Zuckerteil wird hauptsächlich in wäßriger Mineralsäure vorgenommen. Nach Marker & Lopez¹⁸² reicht in den meisten Fällen ein dreistündiges Kochen der Glykoside mit 2n-Aethanol-wäßriger (5:1)-Salzsäure aus. Enthält der Zuckeranteil des Saponins Uronsäure, oder besteht er gar nur aus Uronsäuren, so ist der Hydrolyse eine Alkoholyse vorzuziehen. Diese Aldehydsäuren werden nämlich nach Voß¹⁸³ durch heiße wäßrige Mineralsäuren weitgehend zerstört und das abgespaltene Aglukon fällt durch diese Zersetzungsprodukte stark verunreinigt an. Voß¹⁸³ führte die Alkoholyse mit dem Ammoniumsalz der Glycyrrhizinsäure durch und konnte feststellen, daß sie leichter

¹⁷⁷ Kofler: Die Saponine Verlag Springer Wien 73 (1927).

¹⁷⁸ Kofler: Die Saponine Verlag Springer Wien 69 (1927).

¹⁷⁹ Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

¹⁸⁰ Fuchs: Scientia Pharm. 15 10 (1947).

¹⁸¹ Kofler: Die Saponine Verlag Springer Wien 82 (1927).

¹⁸² Marker & Lopez: Amer. Soc. 69 2386 (1947).

¹⁸³ Voß: Ber. dtsh. chem. Ges. 70 I 124, 132 (1937).

als die Hydrolyse erfolgt. Zudem erhält man dabei schön kristalline und fast analysenreine Ester der Glycyrrhetinsäure.

Im allgemeinen Teil dieser Arbeit wurde bereits in eingehender Weise das chemische und physikalische Verhalten des Aglukons aufgezeigt. Es sollen daher an dieser Stelle nur noch diejenigen Eigenschaften näher erörtert werden, welche für eine quantitative Bestimmung in Frage kommen können. Als solche wären zu nennen, die Esterbildung, die optische Aktivität des Aglukons, seine hämolytische Wirksamkeit und nicht zuletzt das Verhalten gegenüber Reagenzien, welche mit dem Aglukon nach Möglichkeit typische Farbreaktionen ergeben.

Tabelle 30

a) Gruppe III: Ermittlung des Glycyrrhizinsäuregehaltes durch Bestimmung des Aglukons

No	Bestimmungsmethode	Bestimmungsform
1	Alkoholyse des Glykosids und gravimetrische Bestimmung des Aglukon-Esters	Glycyrrhetinsäure-Methylester
2	Hydrolyse oder Alkoholyse des Glykosids und Bestimmung der spezifischen Drehung des Aglukons, resp. des Aglukon-Esters	Glycyrrhetinsäure, resp. Glycyrrhetinsäure-Methylester
3	Hydrolyse des Glykosids und Bestimmung der hämolytischen Wirkung des Aglukons	Glycyrrhetinsäure
4	Hydrolyse des Glykosids und kolorimetrische Bestimmung des Aglukons	Glycyrrhetinsäure

b) Bemerkungen zu den einzelnen Verfahren:

ad 1) Gravimetrische Bestimmung des Aglukons:

Auf Grund der Ausführungen von V o ß¹⁸⁴, wonach die Alkoholyse viel leichter als die Hydrolyse erfolgt und zudem beinahe analysenreine Ester in Kristallform liefert, wurde von uns untersucht, ob die Spaltung des Glykosids quantitativ verläuft.

Zu diesem Zwecke wurden in 2 Versuchen je 1,000 g analysenreines Monoammonium-Glycyrrhizinat von der Zusammensetzung $C_{42}H_{85}O_{16}N \cdot 4H_2O$ (Mol. Gewicht : 912) nach den Angaben von V o ß¹⁸⁵ der Alkoholyse unterworfen und dabei 0,524 g und 0,526 g Glycyrrhetinsäure-Methylester erhalten,

¹⁸⁴ V o ß : Ber. dtsh. chem. Ges. **70** I 124 (1937).

¹⁸⁵ V o ß : Ber. dtsh. chem. Ges. **70** I 131 (1937).

was im Durchschnitt 99 % der theoretischen Berechnung ausmacht. Nach diesen günstigen Ergebnissen mit der analysenreinen Substanz, wurden von uns gleiche Versuche mit der Droge ausgeführt. Wir extrahierten 10 g Süßholzwurzelpulver nach den Angaben von Eder & Sack¹⁸⁶ und verarbeiteten den Drogenauszug weiter zur Bleifällung. Der Bleiglycyrrhizinat-Niederschlag wurde bei höchstens 50° im Trockenschrank getrocknet und hierauf mit 3 %iger methylalkoholischer Salzsäure gespalten. Dabei trat aber eine ziemlich starke Verfärbung der Reaktionsflüssigkeit ein, was unter Umständen durch die Ueberführung des Liquiritins von der farblosen Flavanon-Form in die gefärbte Oxychalkon-Form verursacht wird. Nach dem Abkühlen schied sich wohl ein Teil des Aglukon-Esters ab, der größere Anteil jedoch konnte erst auf Zusatz der achtfachen Menge Wasser zur amorphen Ausscheidung gebracht werden. Der Glycyrrhetinsäure-Methylester fiel bräunlich gefärbt an und lieferte bei der gravimetrischen Bestimmung zu hohe Werte, weshalb diese Methode für eine quantitative Glycyrrhizinsäurebestimmung nicht in Frage kommt.

ad 2) Bestimmung des Aglukons auf Grund seiner optischen Aktivität:

Noch ungünstiger gestalteten sich die Verhältnisse, als wir versuchten, den auf obige Weise aus der Droge gewonnenen Glycyrrhetinsäure-Methylester in absolutem Alkohol gelöst unter Berücksichtigung seiner spezifischen Drehung zu bestimmen. Die Lösung des Aglukons in absolutem Alkohol war so dunkel gefärbt, daß eine Bestimmung der optischen Aktivität unmöglich war. Bewirkte man durch Anlegen von Verdünnungen eine Aufhellung der Lösung, so war der Drehungswinkel zu klein, um noch bestimmt werden zu können. Die färbende Verunreinigung scheint jedoch nicht optisch aktiv zu sein, da auch damit keine Drehung beobachtet werden konnte.

ad 3) Bestimmung des Aglukons auf Grund seiner hämolytischen Wirkung:

Aus Analogiegründen zur Saponinbestimmung heraus versuchten wir nach der Glykosidspaltung das Aglukon mit Hilfe des hämolytischen Index zu bestimmen. Dabei wurden 5 Versuche mit reiner Glycyrrhetinsäure ausgeführt, welche aus analysenreinem, primärem Ammoniumglycyrrhizinat durch Hydrolyse hergestellt worden war. Es konnte ein hämolytischer Index von 11 000 für die Glycyrrhetinsäure festgestellt werden. Als wir nun aus der Droge mit verd. Alkohol das Saponin extrahierten, aus dem Alkohol-Wasser-Gemisch die Glycyrrhizinsäure mit gesättigter, neutraler Bleiazetatlösung fäll-

¹⁸⁶ Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

ten und die Bleifällung hydrolysierten, ergab das Aglukon nach dem Ausschütteln aus der Spaltungsflüssigkeit mit organischen Lösungsmitteln, einen soviel kleineren, hämolytischen Index, daß auf Grund dessen gar keine quantitative Bestimmung der Glycyrrhetinsäure aufgebaut werden konnte.

Es scheinen sich somit Koflers¹⁸⁷ Ausführungen zu bestätigen, wonach die Saponine bei der Extraktion und vor allem bei der Reinigung über das Bleisalz wesentlichen Veränderungen hinsichtlich ihrer chemischen und physiologischen Eigenschaften unterworfen sind.

Aus dem Dargelegten geht deshalb hervor, daß eine Glycyrrhizinsäurebestimmung in vereinfachtem Rahmen durch Bestimmung des Aglukons auf gravimetrischem Wege, oder durch Ermittlung seiner spezifischen Drehung, sowie seiner hämolytischen Wirkung, nicht ausgeführt werden kann. Sollte es jedoch möglich sein, den bei der Alkoholyse aus dem Wurzelauszug unrein anfallenden Glycyrrhetinsäure-Ester auf chromatographischem Wege verlustlos zu reinigen, so würde diese Methode zu schön kristallisierenden, fast analysenreinen Aglukon-Estern führen, die mühelos gravimetrisch bestimmt werden könnten. Uns schien es zweckmäßiger, eine Methode aufzusuchen, welche es erlauben würde, das Aglukon mit Hilfe einer charakteristischen Farbreaktion auf kolorimetrischem Wege zu bestimmen.

ad 4) Bestimmung des Aglukons auf kolorimetrischem Wege:

Auf der Suche nach Farbreaktionen, welche bereits zum qualitativen Nachweis der Glycyrrhizinsäure dienen, wurden von uns eine ganze Reihe von Reagenzien durchgeprüft, die zum Teil schon Bertolo¹⁸⁸ veröffentlicht hatte. Wir konnten feststellen, daß sich für die Ausarbeitung zu einer quantitativen Bestimmung am besten die Reaktion mit Vanillin und Schwefelsäure eignet. Bis damit jedoch reproduzierbare Werte erhalten wurden, bedurfte es zahlreicher, langwieriger Versuche.

e) Untersuchung der Farbreaktion des Glycyrrhizins mit Vanillin und konz. Schwefelsäure nach Bertolo¹⁸⁹

Es schien uns wichtig, durch verschiedene Versuche Näheres über das Zustandekommen dieser Farbreaktion in Erfahrung bringen zu können. Dazu wurden folgende Reinsubstanzen mit Vanillin und Schwefelsäure geprüft und dabei nachstehende Resultate erhalten:

¹⁸⁷ Kofler: Die Saponine Verlag Springer Wien 57 (1927).

¹⁸⁸ Bertolo: Industriale Chimica ed Applicata 7 405 (1925).

¹⁸⁹ Bertolo: Industriale Chimica ed Applicata 7 405 (1925).

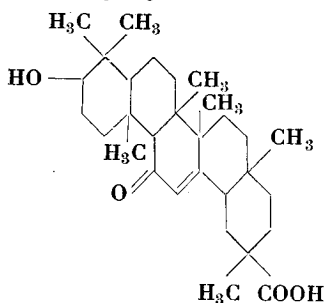
Tabelle 31

Substanz	Ausfall d. Farbreaktion
Mono-Ammonium-Glycyrrhizinat	positiv
Mono-Kalium-Glycyrrhizinat	positiv
Reine Glycyrrhizinsäure	positiv
Reine Glycyrrhetinsäure	positiv
α -Glycyrrhetinsäure-Methylester	positiv

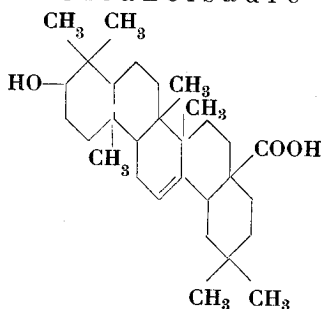
Aus der Tabelle ist eindeutig ersichtlich: Sowohl das freie Glykosid wie dessen Salze, wie auch das freie Aglukon und dessen Ester, geben positive Reaktion mit Vanillin und Schwefelsäure. Aehnlich wie bei der Reaktion der Saponine mit konz. Schwefelsäure¹⁹⁰, scheint auch hier für das Zustandekommen der charakteristischen Farbe allein das Aglukon verantwortlich gemacht werden zu müssen. Ferner untersuchten wir, ob diese Farbreaktion unter Umständen als spezifisch für Stoffe mit triterpenartigem Grundkörper angesprochen werden dürfe. Zu diesem Zwecke prüften wir die der Glycyrrhetinsäure sehr ähnliche und von ihr nur durch ein Sauerstoffatom sich unterscheidende Oleanolsäure.

Dabei ergab die Oleanolsäure eine ganz ähnlich gefärbte Lösung wie das Glycyrrhizin und die Farbstoffbildung war mit gleichen Mengen Oleanolsäure viel intensiver als bei der Glycyrrhizinsäure. Dies ist weiterhin eine Bestätigung, daß die Farbreaktion vom Aglukon hervorgerufen wird. Auch mit den gleichen Mengen Glycyrrhetinsäure respektive Glycyrrhetinsäure-Methylester wurden Färbungen erzielt, die in bezug auf ihre Intensität derjenigen der Oleanolsäure entsprachen. Beim Vergleichen der Konstitutionsformeln der beiden Aglukone kommt man zu folgenden Feststellungen:

aa) Glycyrrhetinsäure



Oleanolsäure



bb) Da beide Sapogenine in gleicher Weise mit Vanillin und Schwefelsäure reagieren, die Oleanolsäure aber zum Unterschied zur Glycyrrhetinsäure keine Keto-Gruppe aufweist, kann wohl mit Recht die Vermutung ausgesprochen werden,

¹⁹⁰ van der Haar: Biochem. Z. 76 333 (1916). Ber. dtsh. chem. Ges. 55 1054 (1922).

daß die Farbreaktion nicht durch die Anwesenheit einer Keto-Gruppe zustandekommt.

cc) Beiden Säuren ist ferner außer der Karboxylgruppe noch eine Oxygruppe gemeinsam, über deren genauere Natur bis anhin nach den Angaben von *Leu en b e r g e r*¹⁹¹ nichts Bestimmtes ausgesagt werden kann. *B e r g m a n n*¹⁹² vermutet, daß die Oxygruppe als sekundäre Alkoholgruppe vorliege.

Diese Vermutung versucht der Verfasser dadurch zu beweisen, daß es ihm bei milder Oxydation von Glycyrrhetinsäure-Methylester mit Chromtrioxyd in Eisessig gelang, eine neutrale Verbindung mit einer Keto-Gruppe herzustellen, welche er Glycyrrhetonsäure-Methylester nannte. Da unseres Wissens nach die Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion nicht auf sekundäre Alkoholgruppen anspricht, darf letzterer wohl nicht die Farbreaktion zugeschrieben werden.

dd) Beide Aglukone enthalten schließlich noch eine Doppelbindung gemeinsam. Bei der Glycyrrhetinsäure kann dieselbe jedoch nicht einmal mit den üblichen Reagenzien für Doppelbindungen, wie Tetranitromethan und sehr verd. Bromlösung, nachgewiesen werden. Es ist daher ohne weiteres die Annahme von der Hand zu weisen, daß die Farbstoffbildung durch die Doppelbindung hervorgerufen werde. — Zusammenfassend kann gesagt werden: Die Farbreaktion, welche Sapogenine von triterpenartigem Grundskelett mit Vanillin und konz. Schwefelsäure ergeben, scheint nicht von einer funktionellen Gruppe des Moleküls hervorgerufen zu werden. Möglicherweise handelt es sich hier um eine freilich chemisch nicht geklärte Reaktion der Triterpene, ähnlich derjenigen von *L i e b e r m a n n - B u r c h a r d*^{193, 194}, welche zum qualitativen Nachweis der Sterine dient. Wenn dies zutrifft, so wäre die Farbstoffbildung, weder von der Reinheit des Glykosids, noch von der Anwesenheit gewisser Verunreinigungen, noch von der bei der Hydrolyse auftretenden Verunreinigung des Aglukons abhängig.

Dies erhofften schon *M e y r a t & M ü h l e m a n n*¹⁹⁵ in ihrer Arbeit, welche sich unter anderem mit der Glykosidbestimmung in *Tinctura Convallariae* auf kolorimetrischem Wege unter Zuhilfenahme der Liebermann-Burchard'schen Reaktion befaßte. Sie fanden freilich, daß die Farbreaktion nicht ganz unabhängig von der Reinheit des Glykosids respektive des Aglukons ist. — Schließlich war noch abzuklären, welche Stoffe außer den Triterpenen imstande sind, mit Vanillin und

¹⁹¹ *Leu en b e r g e r*: Zur Kenntnis der Glycyrrhetinsäure Diss. ETH Zürich 23 (1938).

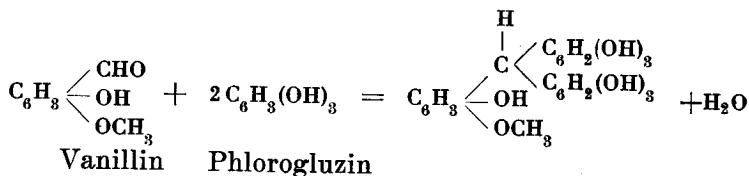
¹⁹² *B e r g m a n n*: Biochem. Z. 267 296 (1933).

¹⁹³ *L i e b e r m a n n*: Ber. dtsh. chem. Ges. 18 1803 (1885).

¹⁹⁴ *B u r c h a r d*: C I 25 (1890).

¹⁹⁵ *M e y r a t & M ü h l e m a n n*: Pharm. Acta Helv. 20 346 (1945).

Schwefelsäure eine Farbreaktion zu geben. Bekanntlich wird die Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion zum Nachweis der phenolischen OH-Gruppe verwendet¹⁹⁶. Danach treten unter dem Einfluß von Säuren Phenole mit Aldehyden zu Derivaten des Diphenyl- und Triphenylmethans zusammen, z. B.:



Da viele dieser Verbindungen die Eigenschaft der Halochromie zeigen, mit anderen Worten, da ihre Additionsprodukte mit konz. Säuren gefärbt sind, können bei Verwendung von konz. Schwefelsäure Farbreaktionen erhalten werden. Bei der Ueberprüfung der Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion mit einzelnen Vertretern ein- und mehrwertiger Phenole wurden nach folgender Ausführungsvorschrift nachstehende Resultate erhalten:

Ausführungsvorschrift:

- 1) 0,5 g Vanillin wird in einem 25 ccm fassenden Meßzylinder in 25 ccm absolutem Alkohol gelöst und in Eiswasser gestellt.
- 2) 50 mg der Phenole werden in 10 ccm konz. Schwefelsäure gelöst.
- 3) 5 ccm der Phenollösung werden tropfenweise zur Vanillinlösung zugefügt, 1 Minute lang im Eiswasser stehen gelassen, hierauf 15 Sekunden lang geschüttelt und die 1. Beurteilung gemacht. Dann wird die Lösung wieder ins Eiswasser gestellt und nach 15 Minuten erfolgt die 2. Beurteilung.

Tabelle 32

Resultate der Farbreaktionen mit Phenolen

Substanz	1. Beurteilung nach 1 Minute	2. Beurteilung nach 15 Minuten
Thymol	rotviolett, leicht gefärbt	rotviolett, stärker rötlich
α -Naphthol	braunrot	dunkel orange-braun
β -Naphthol	schwach gelbgrün	intensiv gelbgrün
Resorzin	intensiv weinrot	sehr intensiv weinrot
Guajakol	schwach gelbgrün	undurchsichtig
Pyrogallol	intensiv blutrot	stärker gelbgrün
Phlorogluzin	intensiv hellblutrot	sehr intensiv blutrot
		sehr intensiv blutrot

Generell kann obiger Zusammenstellung entnommen werden, daß alle untersuchten Phenole mit Vanillin und Schwefelsäure unter Farbstoffbildung reagieren, daß mit wechselnder Anzahl von Hydroxylgruppen die Farbe der Lösung variiert und daß mit steigender Anzahl von phenolischen OH-Gruppen die Farbintensität zunimmt. In keinem Falle aber wurden unter

¹⁹⁶ Rosenthaler: Der Nachweis organischer Verbindungen Verlag Enke Stuttgart 236 (1914).

den gewählten Versuchsbedingungen gleiche oder ähnliche Farbnuancen erzielt, wie dies bei den Triterpenen der Fall war.

In der Ph. H. V dient die Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion zum Nachweis von Amylenhydrat. Wird mit Amylenhydrat in der oben angegebenen Weise die Reaktion ausgeführt, so entsteht eine den Triterpenen ähnliche Farbreaktion, doch zeigt die Lösung nicht eine rein blaue, sondern eine blaugrüne Färbung. Als Vertreter der Sterine wurde Cholesterin in obiger Versuchsanordnung geprüft und ein ebenfalls positiver Ausfall der Reaktion erhalten. Auch hier herrschte in der gewählten Verdünnung der blaugrüne Farbton vor. Andererseits prüften wir die Glycyrrhizinsäure und ihre Salze mit dem Liebermann-Burchard'schen Reagens und fanden, daß ebenfalls eine positive Reaktion mit den Triterpenen eintrat. Die Chloroformlösung färbte sich rosarot und vertiefte die Farbe zunehmend, schlug aber zum Unterschied zu den Sterinen nicht in Blau oder Dunkelgrün um. Es darf daher die Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion ebensowenig als spezifisch auf Triterpene angesehen werden, wie die Liebermann-Burchard'sche-Reaktion auf Sterine. Doch kann bei Abwesenheit oben geprüfter Stoffe die Farbreaktion zum Nachweis der Triterpene herangezogen werden.

Die dargelegten Gründe veranlaßten uns, die für den qualitativen Nachweis der Glycyrrhizinsäure benutzte Farbreaktion mit Vanillin und konz. Schwefelsäure, zu einer quantitativen Bestimmungsmethode auszubauen.

d) Prinzip der Bestimmungsmethode:

Beim Versetzen einer ca. 2 %igen Lösung von Vanillin in absolutem Alkohol mit einer Lösung von Glycyrrhizinsäure in konz. Schwefelsäure, entsteht je nach der Glykosidmenge eine blaue bis violette Färbung, deren Extinktionswert sich im Pulfrich-Photometer bei einer Schichtdicke von 0,5 cm mit dem Filter S 55 ermitteln läßt. Dabei muß freilich noch die geringe Verfärbung der Lösung berücksichtigt werden, welche beim Versetzen der alkoholischen Vanillinlösung mit konz. Schwefelsäure entsteht und somit durch die Reagenzien allein verursacht wird.

Grundsätzlich mußten für die Brauchbarkeit dieser Methode folgende Bedingungen festgelegt werden, die sich weitgehend am Blindversuch auffinden ließen:

e) Prüfung der Reaktionsbedingungen für den Blindversuch

Vorversuche: Wurden nebeneinander mit genau gleichen Mengen der an der Reaktion teilnehmenden Stoffe mehrere Proben angesetzt, so ergaben sie in den meisten Fällen verschiedene Resultate. Mit steigender Vanillinkonzentration nahm der Extinktionswert zu. Wir wählten nun diejenige Vanillin-

menge, welche, gelöst in absolutem Alkohol, nach Möglichkeit einen Extinktionswert von Null ergab. Diese Bedingung wurde bei Verwendung von Filter S 55 von einer ca. 2 %igen Lösung von Vanillin in absolutem Alkohol erfüllt. Zur Herstellung dieser Lösung wurden genau 0,500 g Vanillin abgewogen und in einen 25 ccm fassenden Meßzylinder mit Glasstopfen gebracht.

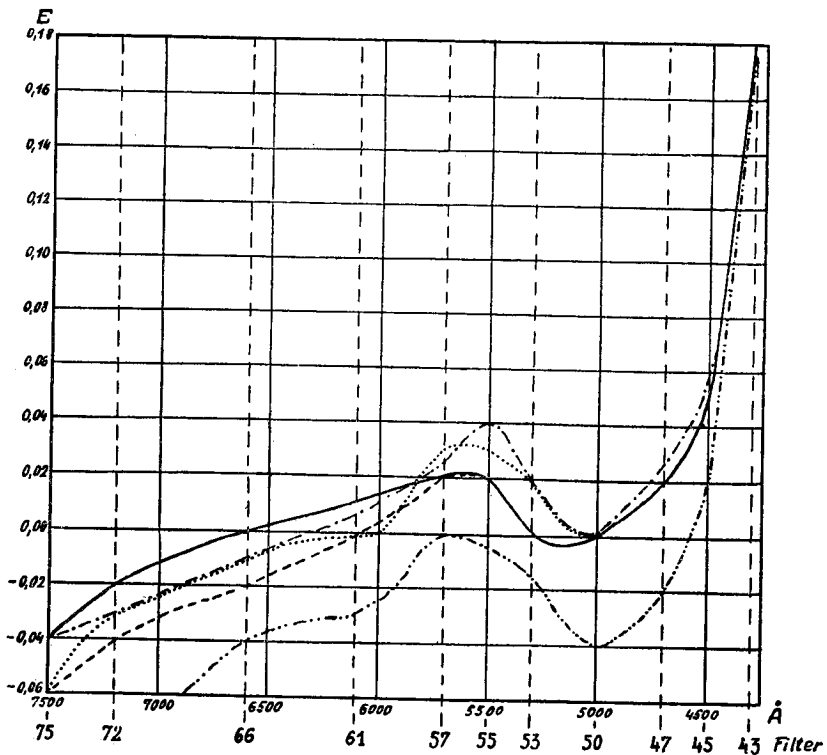
Aus einer Pipette wurden 25 ccm absoluter Alkohol hinzugefügt und das Vanillin durch Schütteln in Lösung gebracht. Wurden mehrere auf obige Weise hergestellte, alkoholische Vanillinlösungen mit je 5 ccm konz. Schwefelsäure versetzt, so entstanden trotzdem wieder verschiedenartige Farbkurven, wie dies nachstehendes Diagramm veranschaulicht:

Diagramm 1

Farbeigenschaften des Vanillin-Schwefelsäure-Reagens

Farbfilterkurve Nr. 1

(Schichtdicke 0,5 cm)



Erst nach genauer Einhaltung folgender Reaktionsbedingungen konnten stets die gleichen Werte für das Vanillin-Schwefelsäure-Reagens erhalten werden:

a) Die Herstellung der Vanillinlösung, sowie das Versetzen derselben mit konz. Schwefelsäure, darf nicht am Tageslicht vorgenommen werden, sondern muß möglichst im Dunkeln bei stark abgeschirmtem Licht erfolgen.

b) Die Vanillinlösung muß gleich nach ihrer Herstellung in Eiswasser gestellt und unter Eiskühlung mit der konz. Schwefelsäure versetzt werden.

c) Die konz. Schwefelsäure soll stets unter den gleichen Bedingungen der Vanillinlösung zugesetzt werden. Zeitlich müssen die 5 ccm konz. Schwefelsäure aus einer Pipette zwischen 30—45 Sekunden zur Lösung hinzugefügt werden. Der Schwefelsäure-Zusatz muß gleichmäßig erfolgen und zwar am besten der Gefäßwandung entlang.

d) Genau nach einer Minute nach dem Schwefelsäure-Zusatz wird der Meßzylinder dem Eiswasser entnommen, die Lösung 15 Sekunden durchgeschüttelt und dann im Eiswasser erkalten gelassen.

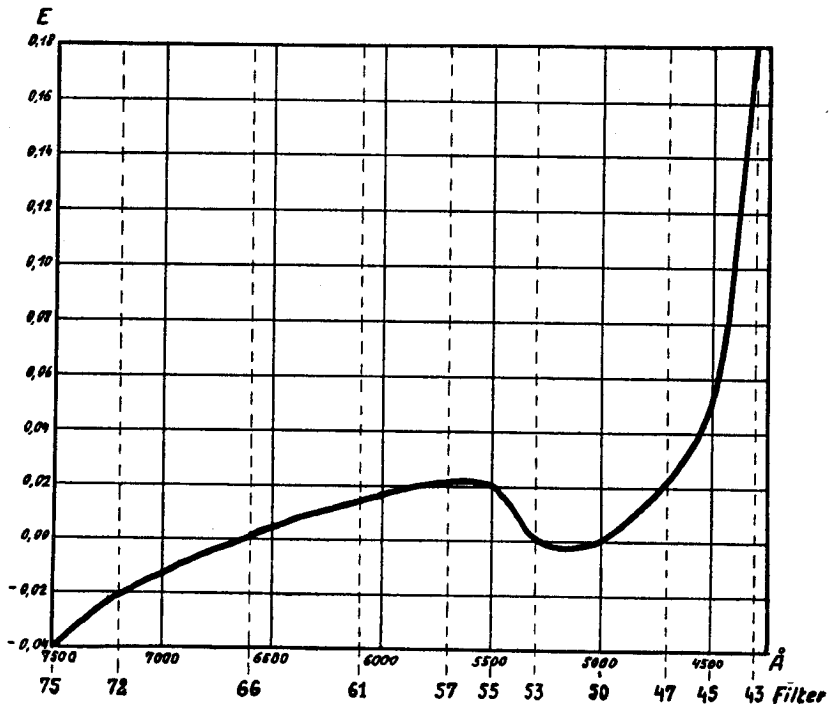
e) Nach 20 Minuten wird der Extinktionswert dieser Lösung kolorimetrisch bestimmt.

Die **Herstellungsvorschrift für den Blindversuch** lautet somit:

«0,5 g Vanillin (genau gewogen) werden in einem 25 ccm fassenden Meßzylinder in 25 ccm absolutem Alkohol (aus der Pipette zugegeben) durch Schütteln gelöst und in Eiswasser gestellt. Das Lösen sowie die nachfolgenden Operationen haben bei abgeschirmtem Licht zu erfolgen. Aus einer Pipette werden hierauf gleichmäßig in einem Zeitintervall von 30—45 Sekunden 5 ccm konz. Schwefelsäure der Glaswandung entlang zu der eisgekühlten Vanillinlösung gegeben, verschlossen, nach 1 Minute 15 Sekunden lang geschüttelt und im Eiswasser erkalten gelassen. Nach 20 Minuten wird die Extinktion bei einer Schichtdicke von 0,5 cm im Pulfrich-Photometer gegen Wasser bestimmt.»

Lösungen, welche nach obiger Vorschrift hergestellt worden waren, ergaben für die Vanillin-Schwefelsäurereaktion folgende, typische Farbkurve:

Diagramm 2
 Farbeigenschaften des modifizierten Vanillin-Schwefelsäure-Reagens
 Farbfilterkurve Nr. 2
 (Schichtdicke 0,5 cm)



f) Bestimmungsversuche mit reinen Salzen der Glycyrrhizinsäure

aa) Reines Mono-Ammoniumglycyrrhizinat:

Die Kohlenstoff- und Wasserstoff-Werte dieses Salzes wurden bereits auf Seite 61 dieser Arbeit wiedergegeben.

bb) Reines Mono-Kaliumglycyrrhizinat:

Dieses Salz wurde von uns aus dem Mono-Ammoniumglycyrrhizinat über das Trikaliumsalz nach der Vorschrift von Voß¹⁹⁷ hergestellt. Die Trocknung der Substanz für die Analyse wurde im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd bei 90° während 24 Stunden vorgenommen und dabei folgende Werte erhalten:

3,744 mg Substanz gaben 7,295 mg CO₂ und 2,510 mg H₂O

3,877 mg Substanz gaben 7,454 mg CO₂ und 2,504 mg H₂O

Die Werte der ersten Analyse stimmten am besten auf ein Salz mit 5 Molekülen Wasser, die der zweiten Analyse auf ein solches mit 6 Molekülen Wasser:

C₄₂H₆₁O₁₆K · 5H₂O : Ber. C 53,03 % H 7,52 %

Gef. C 53,17 % H 7,50 %

C₄₂H₆₁O₁₆K · 6H₂O : Ber. C 52,05 % H 7,59 %

Gef. C 52,47 % H 7,23 %

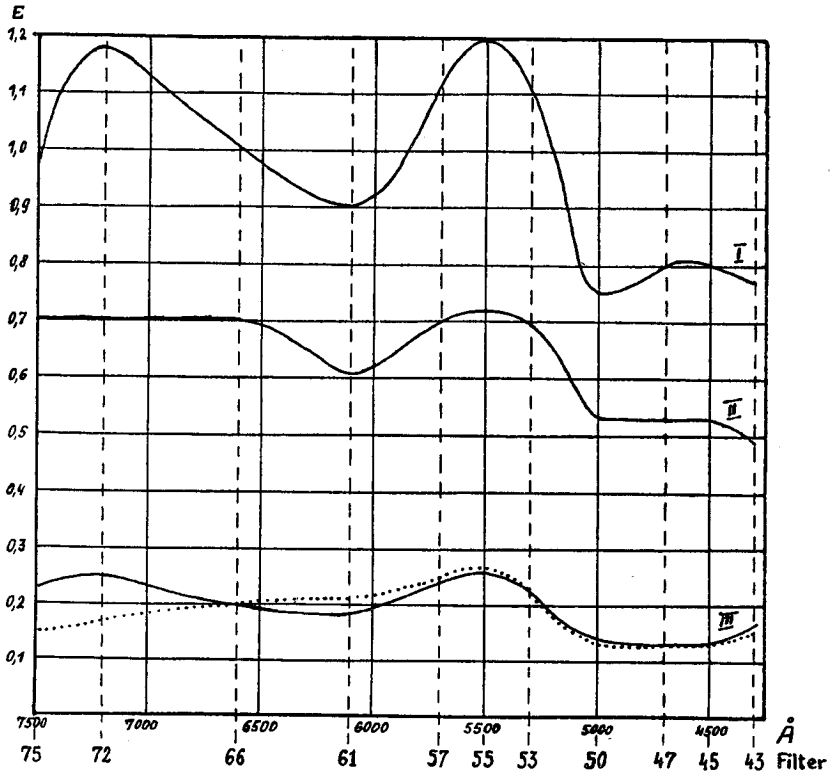
Ausführungsvorschrift:

«10–100 mg Reinsubstanz (genau gewogen) werden in 10 ccm konz. Schwefelsäure (aus der Pipette zugefügt) bei abgeschirmtem Licht gelöst, indem man zuerst 5 Minuten schüttelt und hierauf 5 Minuten stehen läßt. Unterdessen wird die ca. 2%ige alkoholische Vanillinlösung analog zum Blindversuch zubereitet und in Eiswasser gestellt. Der Reinsubstanzlösung in konz. Schwefelsäure werden mit der Pipette 5 ccm entnommen, der Vanillinlösung in gleicher Weise wie beim Blindversuch zugesetzt und weiter wie daselbst verfahren.»

Die kolorimetrische Bestimmung im Pulfrich-Photometer kann entweder gegen den Blindversuch, oder gegen Wasser vorgenommen werden. Im letzteren Falle gelangt der Extinktionswert des Blindversuches in Abzug. Grundsätzlich wurden sämtliche Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen auf kolorimetrischem Wege gegen den Blindversuch ausgeführt. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß Vanillin je nach seinem Reinheitsgrad verschiedene Extinktionswerte ergab. Die Lösungen zeigen konstante, unten wiedergegebene Extinktionswerte in einem Zeitintervalle von 20 Minuten bis einer Stunde nach ihrer Herstellung:

¹⁹⁷ Voß : Ber. dtsh. chem. Ges. 70 I 129 (1937).

Diagramm 3
 Farbfilterkurven 3, ermittelt mit verschiedenen Mengen Ammonium-
 und Kaliumglycyrrhizinat
 (Schichtdicke 0,5 cm)



- I 50 mg Kaliumglycyrrhizinat in 5 ccm konz. Schwefelsäure —————
- II 30 mg Kaliumglycyrrhizinat in 5 ccm konz. Schwefelsäure ————
- III 10 mg Kaliumglycyrrhizinat in 5 ccm konz. Schwefelsäure ————
- III 10 mg Ammoniumglycyrrhizinat in 5 ccm konz. Schwefelsäure.....

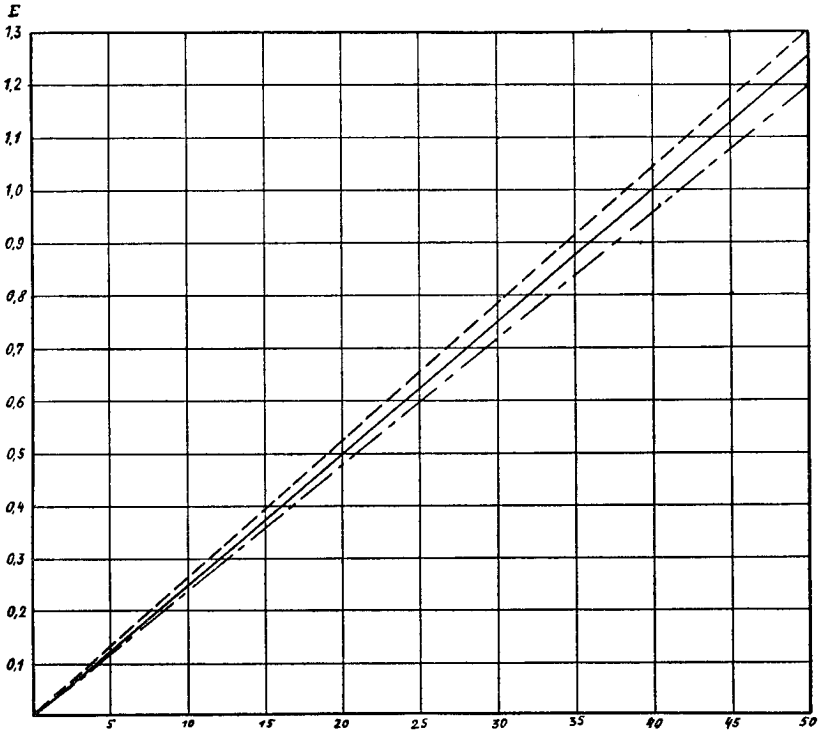
Dem Diagramm 3 ist zu entnehmen, daß die Filter S 55 und S 72 die größten Extinktionswerte ergeben. Die Werte, welche mit Filter S 55 erhalten werden, sind regelmäßiger und auch besser festzustellen, weshalb sämtliche Bestimmungen fortan nur noch mit Filter S 55 ausgeführt wurden. Der Anstieg der Extinktion verläuft dabei ziemlich linear, wie nachstehende Abbildung dies deutlich zeigt:

Diagramm 4

Eichkurve für
Ammoniumglycyrrhizinat, Kaliumglycyrrhizinat und
Glycyrrhetinsäure

Filter S 55

Schichtdicke 0,5 cm



- mg Ammoniumglycyrrhizinat in 5 ccm konz. Schwefelsäure
----- mg Kaliumglycyrrhizinat in 5 ccm konz. Schwefelsäure
----- mg Glycyrrhetinsäure in 10 ccm konz. Schwefelsäure

Der auf Grund der Extinktionswerte der beiden Salze der Glycyrrhizinsäure erhaltene Mittelwert, wurde als Eichkurve für analysenreine Glycyrrhizinsäure errechnet und übereinstimmend mit den praktisch ermittelten Mengen Aglukon in mg aus α -Glycyrrhetinsäure-Methylester gefunden, welche in 10 ccm konz. Schwefelsäure vorhanden sind. Diese Extinktionswerte des Aglukons in 10 ccm Lösungsmittel finden sich in Diagramm 4 als ausgezogene Gerade wiedergegeben, und können zur Errechnung des Glycyrrhizinsäuregehaltes verwendet werden.

Rechnerisch kann der Extinktionswert, welcher von 10 mg Aglukon in 5 ccm konz. Schwefelsäure bei einer Schichtdicke von 0,5 cm mit Filter S 55 hervorgerufen wird, wie folgt bestimmt werden.

a) 10 mg $C_{42}H_{61}O_{16}K \cdot 5H_2O$ (Mol. Gew. 951) in 5 ccm konz. Schwefelsäure ergeben einen Extinktionswert $E = 0,24$.

Da das Molekulargewicht der Glycyrrhetinsäure 470 beträgt, kann folgende Proportion aufgestellt werden:

$$951 : 470 = 100 : x ; \quad x = 49,42 \quad \text{das heißt:}$$

10 mg $C_{42}H_{61}O_{16}K \cdot 5H_2O$ enthalten 4,9 mg Aglukon, oder, weil die Farbreaktion vom Aglukon allein hervorgerufen wird:

4,9 mg Aglukon verursachen eine Extinktion $E = 0,24$ oder:

10 mg Aglukon ergeben einen Extinktionswert $E = 0,49$

b) 10 mg $C_{42}H_{61}O_{16}NH_4 \cdot 4H_2O$ (Mol. Gew. 912) in 5 ccm konz. Schwefelsäure ergeben einen Extinktionswert $E = 0,26$.

Es kann auch in diesem Falle folgende Proportion aufgestellt werden:

$$912 : 470 = 100 : x ; \quad x = 51,53 \quad \text{das heißt:}$$

10 mg $C_{42}H_{61}O_{16}NH_4 \cdot 4H_2O$ enthalten 5,1 mg Aglukon, oder:

5,1 mg Aglukon verursachen eine Extinktion $E = 0,26$ oder:

10 mg Aglukon ergeben einen Extinktionswert $E = 0,51$.

Die auf 10 mg Aglukon in 5 ccm konz. Schwefelsäure umgerechneten Extinktionswerte der glycyrrhizinsäuren Salzlösungen ergeben somit im Mittel einen Extinktionswert : $E = 0,50$.

Da beim Auftragen der Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Konzentration bei beiden untersuchten Salzen der Glycyrrhizinsäure eine gerade Linie entsteht, kann darauf das Lambert-Beersche Absorptionsgesetz angewendet werden. Dieses besagt, daß die Extinktions-Koeffizienten zweier Lösungen im gleichen Verhältnis wie ihre Konzentrationen stehen. Unter dem Extinktionskoeffizienten versteht man den in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke bestimmten Extinktionswert einer Lösung. In unserem Falle ergeben die in einer Küvette von 0,5 cm Schichtdicke ermittelten Extinktionswerte mit 2 multipliziert die Extinktionskoeffizienten der betreffenden Lösungen. 10 mg Glycyrrhetinsäure in 5 ccm konz. H_2SO_4 (durch Berechnung aus den Extinktionswerten der glycyrrhizinsäuren Salze erhalten) weisen infolgedessen einen Extinktionskoeffizienten von 1,0 auf.

Durch Anwendung des Lambert-Beerschen Absorptionsgesetzes läßt sich mit diesen Angaben ohne weiteres der Glycyrrhetinsäure-Gehalt einer Lösung auf Grund ihres Extinktionskoeffizienten berechnen.

Lambert-Beersches Absorptionsgesetz:

$$C_2 = \frac{C_1}{K_1} K_2 \quad \text{wobei:}$$

K_1 = Extinktionskoeffizient einer Lösung mit bekannter Konzentration C_1 ist, und

K_2 = Extinktionskoeffizient einer Lösung mit unbekannter Konzentration C_2 ist.

Die Formel kann wesentlich vereinfacht werden, wenn man für die Lösung mit bekannter Konzentration eine solche wählt, welche in 5 ccm konz. H_2SO_4 10 mg Glycyrrhetinsäure enthält. Diese Lösung hat, wie oben angeführt wurde, einen Extinktionswert von $E = 0,5$, was einem Extinktionskoeffizienten von 1,0 entspricht. Es wird daher $C_1 = 10$ und $K_1 = 1,0$ und somit wird die Formel erhalten:

$$C_2 = K_2 \cdot 10$$

In der Literatur findet man bei der Gehaltsbestimmung der Süßholzwurzel und der daraus hergestellten Präparate den erhaltenen Wert immer auf Glycyrrhizinsäure (Mol. Gew. 823) und nicht auf Glycyrrhetinsäure (Mol. Gew. 470) berechnet angegeben. Zur Umrechnung des Aglukons in Glycyrrhizinsäure dient folgende Proportion:

$$\begin{aligned} 823 : 470 &= 100 : x ; x = 57,10 \quad \text{und} \\ 100 : 57,1 &= y : 1 ; y = 1,75 \quad \text{das heißt:} \end{aligned}$$

Um eine bestimmte Menge Glycyrrhetinsäure in Glycyrrhizinsäure umzurechnen, muß die Menge Aglukon mit dem Faktor 1,75 multipliziert werden.

Umrechnungsfaktor:

$$\text{Aglukon in Glykosid : } F = 1,75.$$

Beispiel: Eine bei einer Schichtdicke von 0,5 cm mit Filter S 55 untersuchte Glycyrrhizinsäurelösung ergab einen Extinktionswert von 0,94, was einem Extinktionskoeffizienten von 1,88 entspricht.

$$C_2 = 1,88 \cdot 10 = 18,8 \quad \text{das heißt:}$$

In 5 ccm konz. H_2SO_4 sind daher 18,8 mg Glycyrrhetinsäure oder $18,8 \cdot 1,75 = 33$ mg Glycyrrhizinsäure enthalten.

Nach diesen brauchbaren Ergebnissen mit Filter S 55 bei den reinen Salzen der Glycyrrhizinsäure wurde versucht, auf dieselbe Weise den Glycyrrhizinsäuregehalt in der Süßholzwurzel quantitativ zu bestimmen. Die Extraktion der Wurzel sowie die Ermittlung des Glycyrrhizinsäuregehaltes derselben wurde nach folgender Methode vorgenommen:

Ausführungsvorschrift:

«1 g Wurzelpulver Sieb IV wird mit 100 ccm eines 0,04 % HCl enthaltenden 50 %igen Alkohols in einer 200 ccm fassenden Arzneiflasche während einer Stunde unter häufigem Umschütteln extrahiert, hierauf durch ein trockenes Filter gelassen und 50 ccm des Filtrates abpipetiert. Letzteres versetzt man im Zentrifugenglas mit 5 ccm einer gesättigten wäßrigen Lösung von neutralem Bleiazetat. Nach dem Dekantieren der überstehenden klaren Flüssigkeit wird der Niederschlag zweimal mit 10 ccm 50 %igem Alkohol aufgeschwemmt und erneut auszentrifugiert. Hierauf wird der Rückstand im Zentrifugenglas eine halbe Stunde lang im Exsikkator über Schwefelsäure evakuiert und dann darin 2 Stunden lang getrocknet. Der getrocknete Rückstand wird durch Zugabe von 10 ccm konz. H₂SO₄ (aus der Pipette) im Zentrifugenglas gelöst und davon mit genau 5 ccm die kolorimetrische Bestimmung ausgeführt. Eine dabei auftretende Trübung der Lösung wird durch Filtrieren oder durch Zentrifugieren vollständig beseitigt.»

Die nach dieser Methode ausgeführten Bestimmungen zeigten mit ein und derselben Droge Resultate, welche in keiner Weise miteinander übereinstimmen, was folgender Zusammenstellung entnommen werden kann:

Tabelle 33

Einwage Droge in g	Extinktionswert S 55 d = 0,5 cm	Glycyrrhizinsäure in %
0,500	0,69	9,7
0,500	0,58	8,1
0,500	0,75	10,5
0,500	0,63	8,7

Kritik der Methode:

Der getrocknete Bleiglycyrrhizinatrückstand ist stark rotbraun bis dunkelbraun gefärbt. Beim Aufnehmen desselben in konz. Schwefelsäure löst sich wohl das Glykosid; das Blei reagiert hingegen mit der Schwefelsäure unter Bildung von Bleisulfat, welches eine mehr oder weniger starke Trübung der Lösung verursacht. Da zur kolorimetrischen Bestimmung nur ganz klare Lösungen verwendet werden können, muß die Lösung durch Filtrieren oder Auszentrifugieren vom Bleisulfat befreit werden. Beide Operationen sind mit Verlusten an Lösungsmittel verbunden, da eine Mischung von Schwefelsäure und absolutem Alkohol vorliegt. Es entsteht eine konzentriertere Lösung, welche zu hohe Extinktionswerte liefert. Ferner

konnten wir nicht feststellen, ob die Verunreinigung, welche die starke Verfärbung des Bleiglycyrrhizinsäures verursacht, ebenfalls die Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion ergibt.

Es war nun unser Bestreben, zu einem möglichst reinen Rückstand zu gelangen, welcher sich klar in der konz. Schwefelsäure löst und die alkoholische Farblösung nicht trübt. Diese Forderungen wurden weitgehend erfüllt, wenn die Bleifällung der Glycyrrhizinsäure hydrolysiert wurde. Als Spaltungsflüssigkeit diente 3 %ige wäßrige Schwefelsäure, die auch von Fuchs¹⁹⁸ bei der Glycyrrhizinsäurebestimmung in der Süßholzwurzel angewendet wurde. Zur Auffindung der Hydrolysebedingungen, welche eine quantitative Aufspaltung des Glykosids gewährleisten, wurde einerseits die Hydrolyse an Reinsubstanz durchgeführt, andererseits aus Reinsubstanz das Aglukon hergestellt und mit einer bestimmten Menge desselben der Extinktionswert der Glycyrrhetinsäure ermittelt.

g) Versuche mit reinem α -Glycyrrhetinsäure-Methylester:

Dieser Ester wurde durch Alkoholyse des glycyrrhizinsäuren Ammoniums mit 3 %iger methylalkoholischer Salzsäure nach der Vorschrift von Voß¹⁹⁹ erhalten. Da die Substanz einen Smp. von 229° ergab, wurde von der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmung abgesehen und einzig der Smp. als Reinheitskriterium herangezogen.

Ausführungsvorschrift: die Bestimmung wurde in gleicher Weise ausgeführt wie bei den reinen Salzen der Glycyrrhizinsäure (s. S. 79).

Substanzmenge: 10 mg in 10 ccm konz. Schwefelsäure (5 mg in 5 ccm Lösungsmittel).

Extinktionswert: ermittelt mit Filter S 55 bei einer Schichtdicke von 0,5 cm : 0,25.

Extinktionskoeffizient: $0,25 \cdot 2 = 0,5$.

Berechnung der Substanzmenge auf Grund des Extinktionskoeffizienten:

$$C_2 = K_2 \cdot 10 = 0,5 \cdot 10 = 5$$

In 5 ccm konz. Schwefelsäure sind demnach 5 mg Glycyrrhetinsäure vorhanden, was mit der Einwage übereinstimmt.

Bei der Berechnung ist freilich noch zu berücksichtigen, daß nicht eine Lösung der Glycyrrhetinsäure (Mol. Gew. 470), sondern eine solche des α -Glycyrrhetinsäure-Methylesters (Mol. Gew. 484) kolorimetrisch geprüft wurde. Diese Differenz bleibt aber bei der Ermittlung des Extinktionswertes für das Aglukon ohne nennenswerten Einfluß.

¹⁹⁸ Fuchs: Scientia Pharm. 15 6 (1947).

¹⁹⁹ Voß: Ber. dtsh. chem. Ges. 70 I 131 (1937).

h) Aufsuchung der geeigneten Hydrolysebedingungen mit Rein- substanz

100 mg $C_{42}H_{61}O_{16}NH_4 \cdot 4H_2O$ wurden in 100 ccm 50 %igem Alkohol gelöst. Zur Weiterverarbeitung gelangten 50 ccm dieser Lösung, welche mit 5 ccm einer wäßrigen, gesättigten Lösung von neutralem Bleiazetat versetzt wurde. Nach dem Auszentrifugieren und Nachwaschen der Bleifällung wurde dieselbe mit 50 ccm 3 %iger, wäßriger Schwefelsäure quantitativ in ein 100 ccm fassendes Rundkölbchen gespült und nach den Angaben von Fuchs²⁰⁰ 4 Stunden lang am Rückflußkühler beim Kochen erhalten. Nach dem Erkalten der Reaktionsflüssigkeit wurde dieselbe in einen Scheidetrichter gegeben und viermal mit 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformauszüge wurden vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und hierauf portionsweise in ein mit Siedesteinchen versehenes und vorher tariertes, 100 ccm fassendes Erlenmeyerkölbchen filtriert. Der nach dem Abdampfen des Chloroforms auf dem Wasserbade verbleibende Rückstand wurde zur Entfernung von Chloroformresten 3mal mit 1—2 ccm 95 %igem Alkohol aufgenommen und jeweils wieder zur Trockne eingedampft. Nach einstündigem Trocknen im Trockenschrank bei 100° wurde der Rückstand in 10 ccm konz. Schwefelsäure gelöst. Von dieser Lösung gelangten 5 ccm zur kolorimetrischen Bestimmung. Es wurden drei Bestimmungen mit je 100 mg Ammoniumsalz (Mol. Gew. 912) nach der genannten Vorschrift ausgeführt und dabei folgende Extinktionswerte erhalten: $E = 0,635 ; 0,645 ; 0,635$; was einen Extinktionsmittelwert von $E = 0,64$ ergibt. Nach der vereinfachten Lambert-Beerschen Formel (Seite 83) entspricht diesem Extinktionswert 12,8 mg Aglukon in 5 ccm konz. Schwefelsäure. Zur kolorimetrischen Bestimmung gelangten von den 50,0 mg Ammoniumglycyrrhizinat in 50 ccm Filtrat, nur 25,0 mg, gelöst in 5 ccm konz. Schwefelsäure. Statt des theoretischen Wertes von 12,88 mg Aglukon in 5 ccm Lösungsmittel wurde als Mittelwert von 3 Bestimmungen 12,80 erhalten, was 99,4 der Einwaage entspricht. Diesen Angaben kann entnommen werden, daß unter Einhaltung obiger Bedingungen die Hydrolyse quantitativ verläuft und daß mit 200 ccm Chloroform die dabei anfallende Glycyrrhetinsäure quantitativ der wäßrigen Lösung entzogen werden kann.

Mit diesen Grundlagen wurde nun erneut versucht, die Glycyrrhizinsäure in der Süßholzwurzel zu bestimmen. Die hauptsächlichsten Phasen bei der Extraktion der Droge, sowie bei der Aufarbeitung zum Aglukon sind im folgenden Schema festgehalten:

²⁰⁰ Fuchs: Scientia Pharm. 15 6 (1947).

i) Vorschlag einer Glycyrrhizinsäure-Bestimmungsmethode des Süßholzes

1 g Droge Sieb IV

Mit 100 ccm 50%igem Alkohol, welcher 0,4 ccm 10%ige Salzsäure auf 100 ccm enthält, 1 Stunde kräftig schütteln. Filtrieren.

Alkohol-Extrakt

50 ccm des Filtrates im Zentrifugenglas mit 5 ccm einer gesättigten wäßrigen Lösung von neutralem Bleiazetat versetzen, zentrifugieren und waschen.

gereinigte Bleifällung

Hydrolytische Spaltung während 4 Stunden am Rückflußkühler mit 50 ccm 3 %iger wäßriger Schwefelsäure.

Niederschlag

Reaktionsflüssigkeit

Aglukon
 PbSO_4

Ausschütteln mit 4mal 50 ccm Chloroform.

Chloroform-Auszüge

Trocknen mit Natriumsulfat, abdestillieren des Chloroforms, Rückstand 3mal mit 1—2 ccm Alkohol aufnehmen und zur Trockne abdampfen.

Chloroform-Rückstand

Trocknen 1 Stunde bei 100°, aufnehmen in 10 ccm konz. Schwefelsäure.

Schwefelsäure Glycyrrhetinsäurelösung

5 ccm Lösung + 25 ccm 2 %ige Vanillinlösung in absolutem Alkohol.

Farblösung

Bestimmung des Extinktionswertes.
Schichtdicke: 0,5 cm.
Zeit: zwischen 20 Minuten und einer Stunde nach Herstellung der Farblösung.

k) Kritik des Bestimmungsvorschlages

aa) **Extraktionsmittel:** Hinsichtlich Art und Menge der Extraktionsflüssigkeit, sowie bei der Extraktionsdauer und den Hydrolysebedingungen, wurde vor allem auf die Arbeiten von Eder & Sack²⁰¹ und Fuchs²⁰² zurückgegriffen, welche sich in eingehender Weise mit diesem Problem befaßten. Danach ist das geeignete Extraktionsmittel noch etwas verdünnte Salzsäure zugesetzt wird. Der Salzsäuregehalt bezweckt das Freilegen der Glycyrrhizinsäure aus ihren Salzen, da das freie Glykosid leichter als seine Salze in 50 %igem Alkohol löslich ist. Linz²⁰³ extrahierte 10 g Wurzelpulver 6mal mit je 50 ccm 50 %igem Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur. Eder & Sack²⁰¹ erschöpften dieselbe Drogenmenge mit einem Gemisch von 50 ccm 50 %igem Alkohol und 3 ccm 10 %iger Salzsäure durch 10 Minuten langes Schütteln, Abnutschen und Nachwaschen mit weiteren Mengen dieses Gemisches, bis daraus insgesamt ca. 200 ccm Auszug resultierten. Fuchs²⁰² extrahiert 0,2 g Radix Liquiritiae pulvis mit 50 ccm einer Mischung von 100 T. 50 %igem Alkohol und 2 T. 2 %iger Salzsäure eine Stunde lang unter häufigem kräftigem Umschütteln. Wir erreichten dies durch Ausziehen von 1 g Wurzelpulver IV mit 100 ccm einer Mischung von 100 Volumteilen 50 %igem Alkohol und 0,4 Volumteilen 10 %iger Salzsäure während einer Stunde durch häufiges, kräftiges Umschütteln.

bb) **Fällung mit Bleiazetat:** Eder & Sack²⁰¹ zeigten, daß beim Versetzen von Reinsubstanzlösungen mit einem Ueberschuß an neutralem Bleiazetat (30 ccm auf 300 ccm 50 %igem Alkohol, welcher rund 0,7—0,8 g Glycyrrhizinsäure gelöst enthält), die Glycyrrhizinsäure quantitativ fällbar ist. Fuchs²⁰² verwendet 10 ccm des nach obiger Vorschrift erhaltenen Filtrates und versetzt dasselbe mit 0,4 ccm der gesättigten, wäßrigen Lösung von neutralem Bleiazetat. Wir fügten zu 50 ccm Filtrat 5 ccm der oben erwähnten Bleiazetat-Lösung, zentrifugierten den Niederschlag ab und wuschen die Bleifällung 2mal mit 10 ccm 50 %igem Alkohol aus. Die überstehenden, vereinigten Flüssigkeitsmengen gaben auf weiteren Zusatz von Bleiazetatlösung keine Fällung mehr, was dafür spricht, daß die Fällung vollständig ist. Dies konnte überdies auch bei der Bestimmung der Glycyrrhizinsäure aus Reinsubstanzlösungen eindrücklich bewiesen werden.

cc) **Hydrolyse-Flüssigkeit:** Als solche verwendeten sowohl Eder & Sack²⁰⁴ als auch Fuchs²⁰⁵ 3 %ige

²⁰¹ Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

²⁰² Fuchs: Scientia Pharm. 15 6 (1947).

²⁰³ Linz: Arch. Pharm. 254 213 (1916).

²⁰⁴ Eder & Sack: Pharm. Acta Helv. 4 23 (1929).

²⁰⁵ Fuchs: Scientia Pharm. 15 7 (1947).

wäßrige Mineralsäure. Die Ersteren zersetzten den von 10 g Droge stammenden Bleiniederschlag mit 100 ccm 3 %iger Salzsäure. Der letztgenannte Autor zerlegte die von 0,04 g Droge herrührende Bleifällung mit 30 ccm 3 %iger Schwefelsäure. In unsere Bestimmung nahmen wir folgende Hydrolysebedingungen auf, welche auf Grund der Reinsubstanz-Spaltung eine quantitative Zerlegung des Glykosids zu gewährleisten scheinen: der von 50 ccm Filtrat stammende Bleiniederschlag (= 0,5 g Droge) wird mit 50 ccm 3 %iger Schwefelsäure 4 Stunden lang am Rückflußkühler zersetzt. Fuchs²⁰⁵ gibt in seiner Arbeit an, daß vierstündiges Kochen zur quantitativen Glykosid-Spaltung ausreicht.

dd) Ausschüttelungs-Flüssigkeit: Da die Glycyrrhetinsäure in Wasser praktisch unlöslich ist, nimmt die Niederschlagsmenge mit der Hydrolysendauer zu. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit samt dem Niederschlag in einen Scheidetrichter gespült und das Aglukon mit insgesamt 200 ccm Chloroform der wäßrigen Mischung entzogen. Als Ausschüttelungsflüssigkeit kommt neben Chloroform noch Aether in Frage. Da aber die Glycyrrhetinsäure in Chloroform sehr gut löslich ist, fiel die Wahl auf letzteres. Beim Ausschütteln bildet sich anfänglich eine Emulsion, welche sich aber nach kurzer Zeit wieder in die beiden Phasen trennt. An der Trennungsfäche befinden sich ungelöstes Bleisulfat, das die Abtrennung der Chloroform-Phase nicht beeinträchtigt. Die Ausschüttelung der Reinsubstanz mit Chloroform nach beendeter Hydrolyse zeigte, daß 200 ccm zum quantitativen Herausholen des Aglukons genügen. In der Literatur findet man diesbezüglich keine Angaben, da bis jetzt nach der hydrolytischen Glykosid-Spaltung stets die Zuckerkomponente in irgend einer Form bestimmt wurde.

ee) Chloroform-Rückstand: Nach einstündigem Trocknen im Trockenschrank bei 100° wird ein schwach gelbgefärbter Rückstand mit z. T. weißen Einschlüssen erhalten. Bei der Ueberprüfung der Spaltungsflüssigkeit war auch an Stelle der Hydrolyse eine Alkoholyse mit 3 %iger methylalkoholischer Salzsäure versucht worden, da nach Voß²⁰⁶ die Alkoholyse der glykosidischen Bindung viel leichter als die Hydrolyse erfolgt. Wir führten beide Spaltungsmöglichkeiten an Reinsubstanz durch und kamen zum gleichen Resultat. Als aber die Bleifällung aus dem Drogenauszug in gleicher Weise zersetzt wurde, fielen die Rückstände bei der Alkoholyse unreiner an, da sich bedeutend mehr färbende Verunreinigungen im Alkohol lösten.

²⁰⁶ Voß: Ber. dtseh. chem. Ges. 70 I 124 (1937).

Zum Unterschied dazu ergab die Ausschüttelung der wäßrigen Hydrolyseflüssigkeit überraschend gute Werte. Wenn auch diese Flüssigkeit oft noch stark braun gefärbt war, ergaben die Chloroform-Auszüge nach dem Abdampfen des letzteren einen höchstens gelblichen Rückstand. Es scheint durch die Chloroform-Ausschüttelung möglich zu sein, das Aglukon weitgehend von den färbenden Verunreinigungen zu trennen, sodaß wir versuchten, die anfallende Glycyrrhetinsäure gravimetrisch zu bestimmen, bevor ihr Extinktionswert im Pulfrich-Photometer ermittelt wurde. Die auf gravimetrischem Wege ermittelten Werte werden später mit den kolorimetrisch gefundenen Werten verglichen.

1) Versuche mit Glycyrrhizinum ammoniacale:

In Vorversuchen wurde festgestellt, ob 100 ccm 50 %igen Alkohols mengenmäßig genügen um 0,5 g Glycyrrhizinum ammoniacale zu extrahieren. Zu diesem Zwecke wurden zwei Versuche mit 0,5 g und 0,1 g Glycyrrhizinum ammoniacale auf 100 ccm angesetzt und weiter wie bei der Bestimmung des Glycyrrhizins in der Droge verfahren. Vom Versuch mit 0,5 g auf 100 ccm wurden 10 ccm, vom zweiten Versuch mit 0,1 g auf 100 ccm wurden 50 ccm weiterverarbeitet, so daß schließlich die gleichen Substanzmengen (= 0,05 g) zur Hydrolyse gelangten. Die Resultate werden in den Tabellen 35—38 wiedergegeben.

Allgemein kann gesagt werden, daß bei Präparaten mit rund 50 % Glycyrrhizinsäure 0,1 g Ausgangssubstanz genügen, und daß vom Auszug vorteilhaft 50 ccm weiter verarbeitet werden. Eine weitere Variante wurde in die Versuchsreihe eingeschaltet, indem vom Auszug (0,5 g Substanz auf 100 ccm Extraktionsmittel) einmal 20 ccm oder 25 ccm und das andere Mal wie vorher 10 ccm zur Bleifällung verwendet wurden. Die dabei erzielten Ergebnisse können den Tabellen 35—38 entnommen werden.

3. Vorschrift zur Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Radix Liquiritiae und Glycyrrhizinum ammoniacale

Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Radix Liquiritiae

«1 g Drogenpulver Sieb IV wird in einer 200 ccm fassenden Arzneiflasche mit 100,0 ccm einer Mischung von 100 T. 50 Vol.%igem Alkohol und 0,4 T. 10 %iger Salzsäure eine Stunde unter häufigem, kräftigem Umschütteln extrahiert und der Drogenauszug filtriert. 50,0 ccm des Filtrates pipettiert man in ein Zentrifugenglas und fällt die Glycyrr-

rhizinsäure durch Zusatz von 5 ccm einer gesättigten, wäßrigen Lösung von neutralem Bleiazetat. Nach dem Durchmischen wird die entstandene Fällung auszentrifugiert, von der überstehenden klaren Flüssigkeit durch Dekantieren getrennt und zweimal mit 10 ccm 50 Vol.-%igem Alkohol aufgeschwemmt und erneut zentrifugiert. Den auf diese Weise gereinigten Bleiniederschlag spült man quantitativ in kleinen Portionen mit 50 ccm 3 %iger Schwefelsäure in ein 100 ccm fassendes Rundkölbehen und spaltet die Glykosidfällung durch vierstündiges Kochen am Rückflußkühler. Nach dem Erkalten wird die Hydrolyseflüssigkeit samt Niederschlag quantitativ durch Nachwaschen mit wenig Wasser in einen Scheidetrichter gegeben und viermal mit 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt, wobei das Chloroform vorerst zum Auswaschen des Rundkölbehens benützt wurde. Die vereinigten Chloroformauszüge werden mit Natriumsulfat getrocknet und portionsweise durch ein trockenes Filter in ein mit Siedesteinchen beschicktes Erlenmeyerkölbehen von 100 ccm Inhalt filtriert. Nach dem Abdestillieren des Chloroform auf dem Wasserbade wird der Rückstand dreimal mit 2 ccm 95 %igem Alkohol aufgenommen und wieder zur Trockne gebracht. Nach einstündigem Trocknen im Trockenschrank bei 100° und Erkaltenlassen im Schwefelsäure-Exsikkator kann damit die kolorimetrische Bestimmung ausgeführt werden. Zu diesem Zwecke müssen die folgenden Manipulationen möglichst im Dunkeln bei stark abgeschirmtem Licht vorgenommen werden. Der getrocknete Rückstand wird in 10,00 ccm (mit der Pipette abgemessen) konzentrierter Schwefelsäure durch 5 Minuten langes Umschwenken oder unter Zuhilfenahme eines Glasstabes gelöst. Hierauf läßt man die schwefelsaure Lösung weitere 5 Minuten stehen. In dieser Zeit werden 0,500 g Vanillin, welche vorher in einem 25 ccm fassenden Meßzylinder mit Glasstopfen eingewogen wurden, durch Zufügen von 25 ccm absolutem Alkohol aus der Pipette durch Umschütteln gelöst und hierauf in Eiswasser vollständig eingetaucht. Dann werden mit einer Pipette 5 ccm der schwefelsauren Lösung entnommen und der in eisgekühlten Vanillinlösung gleichmäßig in einem Zeitintervall von 30—45 Sekunden der Wandung entlang zufließen gelassen. Nach einer Minute entnimmt man den Meßzylinder der Eiskühlung, schüttelt 15 Sekunden lang durch und stellt denselben erneut in Eiswasser. Innerhalb 20—60 Minuten nach Herstellung der Farblösung wird der Extinktionswert der gekühlten Lösung im Pulfrich-Photometer unter Vorschaltung des Filters S 55 in einer Küvette von 0,5 cm Schichtdicke ermittelt.»

Der Gehalt an Glycyrrhizinsäure wird wie folgt nach der für unsere Zwecke vereinfachten Lambert-Beerschen Formel ermittelt.

$$C_2 = K_2 \cdot 10$$

Zur Umrechnung der auf diese Weise erhaltenen Menge Glycyrrhetinsäure in mg in 5 ccm konz. Schwefelsäure auf den Glycyrrhizinsäuregehalt der Droge in Prozenten muß C_2 mit 7 multipliziert werden. Die Berechnung kann auch mittels der Eichkurve auf Seite 81 erfolgen.

Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Glycyrrhizium ammoniacale.

«0,1 g Glycyrrhizium ammoniacale werden in einer 200 ccm fassenden Arzneiflasche mit 100 ccm einer Mischung von 100 T. 50 Vol.-%igem

Alkohol und 0,4 T. 10 %iger Salzsäure eine Stunde unter häufigem, kräftigem Umschütteln extrahiert und der Auszug filtriert. Im weiteren verläuft die Bestimmungsmethode in gleicher Weise wie bei der Süßholzwurzel.»

Bei der Berechnung der Glycyrrhizinsäuremenge muß jedoch berücksichtigt werden, daß nicht 1 g, sondern 10mal weniger Substanz eingewogen wurden und infolgedessen die Aglukonmenge in mg in 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure nicht mit 400, sondern mit 4000 multipliziert werden muß um den prozentualen Gehalt an Glycyrrhetinsäure in Glycyrrhizinum ammoniacale zu erhalten. Im übrigen bleibt auch die Berechnung dieselbe wie bei der Droge.

a) Praktische Ergebnisse der Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen

c) In Radix Liquiritiae

Tabelle 34

Radix Liquiritiae

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch
Einwage	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g
Menge des Extraktionsmittels	100 ccm	100 ccm	100 ccm	100 ccm	100 ccm	100 ccm
Verarbeitet zur Bleifällung	50 ccm	50 ccm	50 ccm	50 ccm	50 ccm	50 ccm
Rückstand gelöst in konz. Schwefelsäure	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm
Verarbeitet zur kolorimetrischen Bestimmung	5 ccm	5 ccm	5 ccm	5 ccm	5 ccm	5 ccm
Extinktionswert, Filter S 55, Küvette 0,5 cm	0,875	0,775	0,625	0,875	0,61	0,675
Extinktionskoeffizient	1,75	1,55	1,25	1,75	1,22	1,35
mg Aglukon in 5 ccm konz. Schwefelsäure	17,5	15,5	12,5	17,5	12,2	13,5
Aglukon in %	7,0	6,2	5,0	7,0	4,9	5,4
Glycyrrhizinsäure in %	12,3	10,8	8,7	12,3	8,65	9,5

β) In Glycyrrhizinum ammoniacale.

Tabelle 35 Glycyrrhizinum ammoniacale aus wäßrigem Auszug

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch
Einwage	05, g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,1 g	0,1 g
Menge des Extraktionsmittels	100 cem	100 cem	100 cem	100 cem	100 cem	100 cem
Verarbeitet zur Bleifällung	25 cem	25 cem	10 cem	10 cem	50 cem	50 cem
Rückstand gelöst in konz. Schwefelsäure	10 cem	10 cem	10 cem	10 cem	10 cem	10 cem
Verarbeitet zur kolorimetrischen Bestimmung	5 cem	5 cem	5 cem	5 cem	5 cem	5 cem
Extinktionswert, Filter S 55, Küvette 0,5 cm	0,765	0,71	0,34	0,35	0,33	0,325
Extinktionskoeffizient	1,53	1,42	0,68	0,70	0,66	0,65
mg Aglukon in 5 cem konz. Schwefelsäure	15,3	14,2	6,8	7,0	6,6	6,5
Aglukon in %	24,5	22,7	27,4	28,0	26,6	26,0
Glycyrrhizinsäure in %	42,9	39,7	47,6	49,0	46,2	45,5

Tabelle 36 Glycyrrhizinum ammoniacale aus NH₃-haltigem Auszug

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Einwage	0,5 g	0,5 g	0,1 g	0,1 g
Menge des Extraktionsmittels	100 cem	100 cem	100 cem	100 cem
Verarbeitet zur Bleifällung	10 cem	10 cem	50 cem	50 cem
Rückstand gelöst in konz. Schwefelsäure	10 cem	10 cem	10 cem	10 cem
Verarbeitet zur kolorimetrischen Bestimmung	5 cem	5 cem	5 cem	5 cem
Extinktionswert, Filter S 55, Küvette 0,5 cm	0,33	0,31	0,32	0,325
Extinktionskoeffizient	0,66	0,62	0,64	0,65
mg Aglukon in 5 cem konz. Schwefelsäure	6,6	6,2	6,4	6,5
Aglukon in %	26,4	24,8	25,6	26,0
Glycyrrhizinsäure in %	46,2	43,4	44,8	45,5

Tabelle 37

Glycyrrhizinum ammoniacale aus NaOH-haltigem Auszug

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch	Versuch
Einwage	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,1 g	0,1 g
Menge des Extraktionsmittels	100 ccm	100 ccm	100 ccm	100 ccm	100 ccm	100 ccm
Verarbeitet zur Bleifällung	20 ccm	20 ccm	10 ccm	10 ccm	50 ccm	50 ccm
Rückstand gelöst in konz. Schwefelsäure	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm
Verarbeitet zur kolorimetrischen Bestimmung	5 ccm	5 ccm	5 ccm	5 ccm	5 ccm	5 ccm
Extinktionswert, Filter S 55, Küvette 0,5 cm	0,63	0,65	0,33	0,33	0,35	0,345
Extinktionskoeffizient	1,26	1,30	0,66	0,66	0,70	0,69
mg Aglukon in 5 ccm konz. Schwefelsäure	12,6	13,0	6,6	6,6	7,0	6,9
Aglukon in %	25,2	26,0	26,4	26,4	28,0	27,6
Glycyrrhizinsäure in %	44,1	45,5	46,2	46,2	49,0	48,3

Tabelle 38

Glycyrrhizinum ammoniacale aus England bezogen

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Einwage	0,5 g	0,5 g	0,1 g	0,1 g
Menge des Extraktionsmittels	100 ccm	100 ccm	100 ccm	100 ccm
Verarbeitet zur Bleifällung	20 ccm	20 ccm	50 ccm	50 ccm
Rückstand gelöst in konz. Schwefelsäure	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm
Verarbeitet zur kolorimetrischen Bestimmung	5 ccm	5 ccm	5 ccm	5 ccm
Extinktionswert, Filter S 55, Küvette 0,5 cm	0,37	0,35	0,18	0,185
Extinktionskoeffizient	0,74	0,70	0,36	0,37
mg Aglukon in 5 ccm konz. Schwefelsäure	7,4	7,0	3,6	3,7
Aglukon in %	14,8	14,0	14,4	14,8
Glycyrrhizinsäure in %	25,9	24,5	25,2	25,9

b) Beurteilung der Resultate:

Der Bleiglycyrrhizinat-Niederschlag war bei der Droge hellbraun, bei Glycyrrhizinum ammoniacale aus England dunkelbraun gefärbt, während derjenige bei den von uns dargestellten Präparaten von schwach hellgelber Farbe war. Die gleiche Abstufung in der Farbe zeigten hernach auch die Hydrolyseflüssigkeiten, wogegen die Chloroformrückstände bei weitem nicht mehr diese Farbunterschiede in derselben Intensität aufwiesen. Sie waren alle von gelblicher Farbe und zeigten rein weiße Einschlüsse, besonders die gereinigten Sorten von Glycyrrhizinum ammoniacale. Da auch der aus Reinsubstanz erhaltene Aglukon-Rückstand schwach gelb gefärbt war, schlossen wir auf weitgehende Reinheit des aus verschiedenen Sorten von Glycyrrhizinum ammoniacale erhaltenen Aglukon-Rückstandes. Dies brachte uns auf den Gedanken, den Rückstand bevor er kolorimetriert wurde, gravimetrisch zu bestimmen. Zu diesem Zwecke wurde der 100 ccm fassende Erlenmeyerkolben mit den Siedesteinchen vorher getrocknet und tariert. Nach Abdampfen des Chloroform und Reinigen mit Alkohol wurde der Rückstand gewogen.

4. Vorschlag für eine vereinfachte Glycyrrhizinsäure-Bestimmungsmethode auf gravimetrischem Wege

Die Tatsache, daß durch die Chloroform-Ausschüttelung das Aglukon der quantitativ hydrolysierten Glycyrrhizinsäure vollständig gewonnen werden kann und selbst aus verunreinigten Drogenauszügen weitgehend gereinigt anfällt, veranlaßte uns, folgende Versuche mit reinem Kaliumglycyrrhizinat auszuführen.

«50 mg Kaliumglycyrrhizinat wurden in 50 ccm 50 %igem Alkohol im Zentrifugenglas gelöst und mit 5 ccm der gesättigten, wäßrigen Lösung von neutralem Bleiazetat versetzt. Der Bleiniederschlag wurde in der gewohnten Weise 4 Stunden am Rückflußkühler hydrolysiert, mit 200 ccm Chloroform ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und hierauf in ein mit Siedesteinchen versehenes, vorher getrocknetes und tariertes Erlenmeyerkölbchen von 100 ccm Inhalt portionsweise filtriert. Der Rückstand wurde dreimal mit 1–2 ccm Alkohol aufgenommen, zur Trockne gebracht und eine Stunde im Trockenschrank bei 100° getrocknet. Nach dem Erkalten im Schwefelsäure-Exsikkator wurde der Rückstand gewogen.»

50 mg Kaliumglycyrrhizinat (Mol. Gew. 951) ergaben als Mittelwert aus drei Bestimmungen (24,3; 25,2; 24,8) = 24,7 mg Aglukon in 50 mg Kaliumglycyrrhizinat, was 100 % der Einwage entspricht.

Gravimetrische Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Radix Liquiritiae

Das Ausziehen der Droge, die Glykosidfällung mit Bleiazetat, deren Zersetzung mit 3 %iger Schwefelsäure, sowie das Ausschütteln mit Chloroform, erfolgen in gleicher Weise wie bei der Bestimmung der Glycyrrhizinsäure auf kolorimetrischem Wege. Im weiteren verlaufen die Bestimmung und Berechnung wie folgt:

«Die vereinigten, mit Natriumsulfat getrockneten Chloroformauszüge werden in ein mit Siedesteinchen beschicktes, vorher getrocknetes und gewogenes Erlenmeyerkölbchen von 100 ccm Inhalt portionsweise filtriert und auf dem Wasserbade vom Chloroform befreit. Der Rückstand wird dreimal zur vollständigen Entfernung des Chloroforms mit 1–2 ccm 95 %igem Alkohol aufgenommen und wieder zur Trockene gebracht. Nach einstündigem Trocknen im Trockenschrank bei 100° und Erkaltenlassen im Schwefelsäure-Exsikkator wird das Gewicht des Rückstandes ermittelt.»

Auf diese Weise erhält man die Anzahl mg Glycyrrhetinsäure in 50 ccm Filtrat (= 0,5 g Droge). Die Multiplikation mit 200 ergibt den prozentualen Glycyrrhetinsäuregehalt der Droge. Multipliziert man denselben mit 1,75, so kann der Glycyrrhizinsäuregehalt der Droge in Prozenten errechnet werden.

Gravimetrische Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Glycyrrhizinum ammoniacale

Hinsichtlich Menge und Extraktionsart, Hydrolyse und Ausschütteln wird auf die kolorimetrische Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Glycyrrhizinum ammoniacale verwiesen. Im weiteren verlaufen Bestimmung und Berechnung wie folgt:

«Die vereinigten, mit Natriumsulfat getrockneten Chloroformauszüge werden in ein mit Siedesteinchen beschicktes, vorher getrocknetes und gewogenes Erlenmeyerkölbchen von 100 ccm Inhalt portionsweise filtriert und auf dem Wasserbade vom Chloroform befreit. Der Rückstand wird zwecks vollständiger Entfernung des Chloroforms dreimal mit 1–2 ccm 95 %igem Alkohol aufgenommen und wieder zur Trockene gebracht. Nach halbstündigem Trocknen im Trockenschrank bei 60° und Erkaltenlassen im Schwefelsäure-Exsikkator wird das Gewicht des Rückstandes ermittelt.»

Dies ergibt die Anzahl mg Glycyrrhetinsäure in 50 ccm Filtrat (= 0,5 g Droge). Die Multiplikation mit 2000 ergibt den prozentualen Glycyrrhetinsäuregehalt der Droge. Multipliziert man denselben mit 1,75, so wird der Glycyrrhizinsäuregehalt der Droge in Prozenten erhalten.

a) Resultate der Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen auf gravimetrischem Wege und Vergleich mit den kolorimetrisch ermittelten Werten.

Tabelle 39

a) bei Radix Liquiritiae: Ausgangsdroge

Substanz	Glycyrrhizinsäure-Gehalt in %			
	auf gravimetrischem Wege		auf kolorimetrischem Wege	
	Einzel	Mittel	Einzel	Mittel
Radix Liquiritiae	12,6		12,3	
	11,9		10,8	
	8,9		8,7	
	12,6	10,7	12,3	10,2
	8,9		8,65	
	9,6		9,5	

Tabelle 40

β) bei Glycyrrhizinum ammoniacale

Substanz	Glycyrrhizinsäure-Gehalt in %			
	auf gravimetrischem Wege		auf kolorimetrischem Wege	
	Einzel	Mittel	Einzel	Mittel
Gl. a. H ₂ O	54,4		45,5	
	53,9		42,9	
	48,3	51,6	47,6	46,2
	49,8		49,0	
Gl. a. NH ₃	52,5		46,2	
	50,7		44,8	
	50,8	51,0	45,5	45,0
	50,2		43,4	
Gl. a. NaOH	48,9		44,1	
	49,8		45,5	
	51,1	50,5	46,2	45,5
	52,5		46,2	
Gl. a. Engl.	28,5		25,9	
	28,7		25,9	
	28,0	27,9	25,2	25,4
	26,3		24,5	

b) Beurteilung der beiden Bestimmungsmethoden und Ablehnung derselben für Radix-Liquiritiae.

Die Zusammenstellungen zeigen, daß die auf gravimetrischem Wege ermittelten Werte ungefähr gleich oder höher sind als diejenigen, welche die kolorimetrische Prüfung ergab.

Der Rückstand scheint deshalb noch etwas verunreinigt zu sein; jedoch ist aus dem auf kolorimetrischem Wege ermittelten Werte zu schließen daß die Verunreinigungen die Farblösung bei der kolorimetrischen Bestimmung in keiner Weise beeinflussen, da letztere Werte nie höher liegen. Ferner ist daraus ersichtlich daß das aus England bezogene Glycyrrhizinum ammoniacale nur ungefähr halb so viel Glycyrrhizinsäure enthält, wie die von uns dargestellten Sorten. Auch letztere unterscheiden sich freilich nur in geringem Ausmaße voneinander, indem das Glycyrrhizinum ammoniacale aus dem wäßrigen Auszug die höchsten, diejenigen aus natronalkalischem und ammoniakalischem Auszug ungefähr gleich große Werte aufweisen.

Was die Bestimmungsmethode selbst anbelangt ist zu sagen, daß die kolorimetrische Methode genauere Werte liefert als die gravimetrische Bestimmung, wenn das verwendete Vanillin den Anforderungen der Ph. Helv. V entspricht und genau nach den Vorschriften gegen den Blindversuch kolorimetriert wird. Die gravimetrische Methode ergibt Werte, die umso näher bei den auf kolorimetrischem Wege ermittelten Resultaten liegen, je reiner die untersuchte Substanz und je vollständiger die Trocknung des Rückstandes ist. Bei den verschiedenen Sorten von Glycyrrhizinum ammoniacale wurde die Trocknung eine halbe Stunde bei 60° vorgenommen, was scheinbar nicht ausreicht. Nach den gut übereinstimmenden Einzelwerten der gravimetrischen und kolorimetrischen Methode bei der Süßholzwurzel wurde auch bei Glycyrrhizinum ammoniacale die Forderung, eine Stunde Trocknen bei 100°, in die Bestimmungsvorschriften aufgenommen. Wenn sich diese quantitative Bestimmung auch besser als die bisherigen gravimetrischen Methoden zur Glycyrrhizinsäurebestimmung eignet, da nicht das schwer zu reinigende Glykosid, sondern das aus wäßriger Lösung mit Chloroform in weitgehend gereinigter Form ausschüttelbare Aglukon bestimmt wird, so konnte das vorliegende Bestimmungsverfahren für die Süßholzdrege nicht genügen.

Die verhältnismäßig großen Unterschiede der Einzelbestimmungen bei der Ausgangsdroge veranlaßten uns, eine Verbesserung der Bestimmungsmethode anzustreben, wobei folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden sollten:

Auswirkung der Drogenmenge auf die Genauigkeit der Methode. Schonendere Herstellung und Aufarbeitung des Chloroformauszuges zu einem in konz. Schwefelsäure leicht löslichen Aglukon-Rückstand. Löslichkeit der Bleiglycyrrhizinat-Fällung in 50 Vol.-%igen Weingeist. Auswirkung einer längeren Hydrolysezeit einerseits, und andererseits einer stärkeren Hydrolyseflüssigkeit.

Auswirkung der Drogenmenge auf die Genauigkeit der Methode.

Es wurden vier Bestimmungen mit je 5,00 g Radix Liquiritiae auf 250 ccm 50 Vol%igen Weingeist durchgeführt, statt wie bisher 1,00 g auf 100 ccm. Diese Abänderung der Drogenmenge sollte eine Uneinheitlichkeit des zur Bestimmung gelangenden Drogenmaterials in seiner Zusammensetzung ausschalten. Die gravimetrischen und kolorimetrischen Bestimmungen ergaben dieselben unterschiedlichen Resultate, wie zuvor mit der kleineren Drogen-Einwage. Es wurden folgende Werte erhalten:

Gravimetrische Bestimmungen: 12,7 %, 9,3 %, 9,8 %, 11,9 %
Kolorimetrische Bestimmungen: 12,4 %, 9,1 %, 9,4 %, 11,6 %

Somit scheint erwiesen zu sein, daß die weit auseinanderliegenden Resultate der einzelnen Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen nicht durch die zur Bestimmung gelangende Drogenmenge verursacht wird. Vielmehr vermuteten wir, daß die Ursachen für die voneinander abweichenden Resultate in der Bestimmungsmethode selbst liegen. Eine schonendere Herstellung und Aufarbeitung des Chloroform-Auszuges schien uns daher am Platze zu sein.

Schonendere Herstellung und Aufarbeitung des Chloroform-Auszuges

«5 g Droge werden in einem 400 ccm fassenden Arzneiglas mit 250 ccm einer Mischung von 250 Teilen 50 Vol%igen Alkohols und 1 Teil 10 %iger Salzsäure eine Stunde lang unter häufigem, kräftigem Umschütteln extrahiert und der Drogenauszug filtriert. 25 ccm des Filtrates (= 0,5 g Droge) werden mit 2,5 ccm einer gesättigten, wäßrigen Lösung von neutralem Bleiazetat versetzt und der nach dem Auszentrifugieren in der vorgeschriebenen Weise gewaschene Bleiglycyrrhizinat-Niederschlag vier Stunden mit 50 ccm 3 %iger Schwefelsäure zersetzt. Die erkaltete Hydrolyseflüssigkeit wird 4mal mit je 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt, wobei die einzeln abgetrennten Chloroform-Auszüge zweimal mit je 5 ccm Wasser nach dem Gegenstrom-Prinzip gewaschen werden. Die so gereinigten Chloroformphasen werden nach dem Trocknen über Natriumsulfat portionsweise in einen tarierten, 100 ccm fassenden Rundkolben mit Langhals filtriert und hierauf im Vakuum zur Trockne gebracht. Zur vollständigen Entfernung des Chloroforms wird am besten an Stelle von Weingeist nun Aether verwendet, wodurch ein schaumiger Aglukon-Rückstand erreicht wird, welcher sich viel leichter in konz. Schwefelsäure löst.»

Die Weiterverarbeitung zur Glycyrrhizinsäure-Bestimmung erfolgte in analoger Weise zur bereits beschriebenen Methode. Von 4 derart ausgeführten Bestimmungen wurden folgende Resultate auf gravimetrischem und kolorimetrischem Wege erhalten:

Gravimetrische Bestimmungen: 9,5 %, 9,7 %, 9,6 %, 9,4 %
Kolorimetrische Bestimmungen: 9,4 %, 9,5 %, 9,4 %, 9,2 %

Auf diese Weise konnten selbst mit der gravimetrischen Methode näher beieinander liegende Werte erhalten werden, welche auch mit den auf kolorimetrischem Wege ermittelten Resultaten besser übereinstimmten. Deshalb wurden die noch zu überprüfenden Punkte des Bestimmungsverfahrens nach der letzten Methode ausgeführt.

Löslichkeit der Bleiglycyrrhizinat-Fällung in 50 Vol. % igem Weingeist.

Das Ausziehen der Droge erfolgte in der oben beschriebenen Weise. 50 ccm des Filtrates wurden in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Entfernung des Weingeistes auf 20 g eingedampft, in einen Meßzylinder gebracht, die Schale mit Wasser nachgespült und auf 50 ccm damit ergänzt. Nach dem Filtrieren gelangten 25 ccm (= 0,5 g Droge) zur Weiterverarbeitung. Vier Bestimmungen ergaben dabei folgende Werte:

Gravimetrische Bestimmungen: 9,2 %, 9,1 %, 9,3 %, 9,3 %

Kolorimetrische Bestimmungen: 9,1 %, 9,0 %, — , 9,1 %

Daraus kann folgendes entnommen werden: Wäre die Bleiglycyrrhizinat-Fällung in 50 Vol. % igem Weingeist zum Teil löslich, so müßten letztere Werte höher liegen, als die früher ermittelten. In Wirklichkeit sind sie aber sogar niedriger. Dies läßt sich wohl daraus erklären, daß beim Eindampfen des schwach sauren, alkoholischen Drogenauszuges bereits ein geringer Teil des Glykosids gespalten wird. Das dabei entstehende Aglukon ist aber in Wasser so gut wie unlöslich und bleibt beim Filtrieren auf dem Filter zurück, wodurch es der Bestimmung entzogen wird.

Wir führten deshalb noch 2 weitere Bestimmungen aus, wobei wir vor dem Eindampfen den sauren Drogenauszug mit verd. Natronlauge neutralisierten, um so eine saure Hydrolyse des Glykosids zu vermeiden. Es konnten aber auch auf diese Weise keine höheren Werte für Glycyrrhizinsäure erhalten werden, als bei der Bleiglycyrrhizinat-Fällung in 50 Vol. % igem Weingeist. Somit darf angenommen werden, daß die Fällung in 50 Vol. % igem Weingeist unlöslich und gleichzeitig vollständig ist.

Auswirkung einer längeren Hydrolysezeit einerseits, und andererseits einer stärkeren Hydrolyseflüssigkeit.

2 Versuche, bei denen die Hydrolysezeit von 4 Stunden auf 5 Stunden erhöht wurde, ergaben dieselben Resultate, wie mit der oben beschriebenen Methode. Dies bestätigt die Annahme,

daß die Hydrolyse in 4 Stunden vollständig ist. Zu prüfen war noch die Verwendung einer stärkeren Hydrolyseflüssigkeit. Bei 2 Bestimmungen wurde die Bleifällung der Glycyrrhizinsäure nicht wie bisher mit 50 ccm 3 %iger Schwefelsäure, sondern mit 50 ccm 10%iger Schwefelsäure 4 Stunden lang kochend zersetzt. Die dabei erzielten Resultate lagen zwischen 8,5—9 %. Allem Anschein nach wirkt sich die Verwendung einer stärkeren Hydrolyseflüssigkeit auf die Bestimmung ungünstig aus, indem vermutlich bereits tiefergreifende Veränderungen bei den Spaltprodukten auftreten. Man ist daher bei der Verwendung von 50 ccm 3 %iger Schwefelsäure imstande, in 4 Stunden bei Siedehitze die anfallende Bleiglycyrrhizinfällung vollständig zu hydrolisieren.

Auf Grund der oben ausgeführten Untersuchungen schlagen wir folgende endgültige Bestimmungsvorschriften für die Glycyrrhizinsäure in der Süßholzwurzel vor:

5) Endgültig bereinigte und vorgeschlagene Vorschrift zur Glycyrrhizinsäure-Bestimmung in Radix-Liquiritiae

a) auf gravimetrischem Wege:

«1 g Drogenpulver Sieb IV wird in einer 200 ccm fassenden Arzneiflasche mit 100,0 ccm einer Mischung von 100 T. 50 Vol.%igem Alkohol und 0,4 T. 10 %iger Salzsäure eine Stunde unter häufigem, kräftigem Umschütteln extrahiert und der Drogenauszug filtriert. 50,0 ccm des Filtrates pipettiert man in ein Zentrifugenglas und fällt die Glycyrrhizinsäure durch Zusatz von 5 ccm einer gesättigten, wäßrigen Lösung von neutralem Bleiazetat. Nach dem Durchmischen wird die entstandene Fällung auszentrifugiert, von der überstehenden klaren Flüssigkeit durch Dekantieren getrennt und zweimal mit 10 ccm 50 Vol.%igem Alkohol aufgeschwemmt und erneut zentrifugiert. Den auf diese Weise gereinigten Bleiniederschlag spült man quantitativ in kleinen Portionen mit 50 ccm 3%iger Schwefelsäure in ein 100 ccm fassendes Rundkölbehen und spaltet die Glykosidfällung durch vierstündiges Kochen am Rückflußkühler. Nach dem Erkalten wird die Hydrolyseflüssigkeit samt Niederschlag quantitativ durch Nachwaschen mit wenig Wasser in einen Scheidetrichter gegeben und viermal nacheinander mit je 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt, wobei die einzelnen Ausschüttelungen jeweils zweimal nach dem Gegenstromprinzip mit je 5 ccm Wasser gewaschen werden. Die auf diese Weise gereinigten Chloroformauszüge werden mit Natriumsulfat getrocknet und portionsweise durch ein trockenes Filter in einen 100 ccm fassenden, vorher tarierten, Rundkolben mit langem Hals filtriert. Durch Absaugen des Chloroforms im Vakuum wird das Aglukon als Rückstand gewonnen. Letzterer wird dreimal mit 3 ccm Aether aufgenommen und im Vakuum wieder zur Trockne gebracht. Der auf diese Weise als Schaum erhaltene Rückstand wird eine Stunde im Trockenschrank bei 100° getrocknet, hierauf im Schwefelsäure-Exsikkator erkalten gelassen und gewogen.»

Auf diese Weise erhält man die Anzahl mg Glycyrrhetinsäure in 50 ccm Filtrat (= 0,5 g Droge). Die Multiplikation mit 200 ergibt den prozentualen Glycyrrhetinsäuregehalt der Droge. Multipliziert man denselben mit 1,75, so kann der Glycyrrhizinsäuregehalt der Droge in Prozenten errechnet werden.

b) auf kolorimetrischem Wege:

Die Extraktion der Droge, die Fällung der Glycyrrhizinsäure aus dem Drogenauszug mit Bleiazetat, deren Zersetzung mit 3 %iger Schwefelsäure, sowie die Aufarbeitung der Chloroformphase zum Aglukon-Rückstand, erfolgen in gleicher Weise, wie bei der gravimetrischen Bestimmung. Im weiteren verlaufen die Bestimmung und Berechnung wie folgt: Sämtliche Manipulationen für die kolorimetrische Bestimmung müssen möglichst im Dunkeln bei stark abgeschirmtem Licht vorgenommen werden:

«Der bei der gravimetrischen Methode als Schaum erhaltene Aglukon-Rückstand wird in 10,0 ccm (mit einer Pipette abgemessen) konzentrierter Schwefelsäure durch 5 Minuten langes Umschwenken und nachfolgendes 5 Minuten langes Stehenlassen gelöst.

In dieser Zeit werden 0,500 g Vanillin, welche vorher in einen 25 ccm fassenden Meßzylinder mit Glasstopfen eingewogen wurden, durch Zufügen von 25,0 ccm absolutem Alkohol aus der Pipette durch Umschütteln gelöst und hierauf in Eiswasser vollständig eingetaucht. Dann werden mit einer Pipette 5,0 ccm der schwefelsauren Lösung entnommen und der eisgekühlten Vanillinlösung gleichmäßig in einem Zeitintervall von 30—45 Sekunden der Wandung entlang zufließen gelassen. Nach einer Minute entnimmt man den Meßzylinder der Eiskühlung, schüttelt 15 Sekunden lang durch und stellt denselben erneut in Eiswasser. Innerhalb 20—60 Minuten nach Herstellung der Farblösung wird der Extinktionswert der gekühlten Lösung im Pulfrich-Photometer unter Vorschaltung des Filters S 55 in einer Küvette von 0,5 cm Schichtdicke ermittelt.»

Der Gehalt an Glycyrrhizinsäure wird wie folgt nach der für unsere Zwecke vereinfachten Lambert-Beerschen Formel ermittelt:

$$C_2 = K_2 \cdot 10$$

Zur Umrechnung der auf diese Weise erhaltenen Menge Glycyrrhetinsäure in mg in 5 ccm konz. Schwefelsäure auf den Glycyrrhizinsäuregehalt der Droge in Prozenten muß C_2 mit 7 multipliziert werden. Die Berechnung kann auch mittels der Eichkurve auf Seite 81 erfolgen.

6) Praktische Ergebnisse der Glycyrrhizinsäure-Bestimmungen auf gravimetrischem und kolorimetrischem Wege für Radix Liquiritiae

Tabelle 41

Substanz	Glycyrrhizinsäure-Gehalt in %			
	auf gravimetrischem Wege		auf kolorimetrischem Wege	
	Einzel	Mittel	Einzel	Mittel
Radix Liquiritiae	9,5		9,4	
	9,7		9,5	
	9,6		9,4	
	9,6	9,5	9,3	9,3
	9,4		9,2	
	9,3		9,1	
	9,4		9,2	
	9,4		9,2	

IV. Aufsuchung des Fluorescenz-erzeugenden Stoffes der Süßholzwurzel

1. Einleitung

Anlässlich eines Vortrages von Steiner²⁰⁷ über den Nachweis von Süßholzfluidextrakten mit Hilfe des ultravioletten Lichtes wurde die Frage aufgeworfen, welcher Stoff in der Süßholzwurzel für das Zustandekommen der Fluorescenz verantwortlich gemacht werden müsse. In einer vorher bereits von ihr veröffentlichten Arbeit²⁰⁸ äußerte sich die Autorin über die Natur des Fluorescenz erzeugenden Inhaltsstoffes von Radix Liquiritiae einzig dahin, daß es sich um eine leicht aetherlösliche Substanz handle, welche bei der wäßrigen Extraktion der Droge nur unter Ammoniakzusatz in Lösung gebracht werden könne. Zudem gestatte der Fluorescenznachweis eine deutliche Unterscheidung zwischen dem Extractum Liquiritiae fluidum Ph. Helv. V und dem Succus Liquiritiae solutus Ph. Helv. IV, da in ersterem Falle die Fluorescenzreaktion positiv ausfällt. Beim Succus Liquiritiae solutus Ph. Helv. IV hingegen könne unter den gleichen Reaktionsbedingungen höchstens ein schwach weißlichblaues Leuchten wahrgenommen werden. In der Diskussion wurde damals die Ansicht vertreten, es könnte

²⁰⁷ Steiner: Vortrag, gehalten an der Schweiz. Naturf. Ges. in Zürich Sept. 1946.

²⁰⁸ Steiner: Pharm. Acta Helv. 21 364 (1946).

sich beim Fluorescenz erregenden Stoff um das Ammonglycyrrhizinat handeln, welches nicht als solches in der Droge vorliegt, wohl aber in den daraus unter Ammoniakzusatz hergestellten Präparaten zu finden ist. Dies würde auch die Tatsache erklären, daß der Süßholzfluidextrakt der Ph. Helv. V zum Unterschied vom Succus Liquiritiae Ph. Helv. IV eine positive Fluorescenzreaktion gibt, da das erstere Präparat, nicht wie der Succus Liquiritiae Ph. Helv. IV, mit Wasser allein, sondern mit ammoniakalischem Wasser hergestellt worden ist. Im Extractum Liquiritiae fluidum Ph. Helv. V findet sich somit die Glycyrrhizinsäure als Ammonglycyrrhizinat vor.

Wir machten uns daher zur Aufgabe, einmal die Frage theoretisch zu prüfen, welche Stoffe überhaupt imstande sind, im ultravioletten Licht Fluorescenzerscheinungen zu geben. Ferner war unser Ziel, reines primäres Ammoniumglycyrrhizinat herzustellen, welches neben der Verwendung zur Ueberprüfung der Glycyrrhizinsäure-Bestimmung auch zur Abklärung der Fluorescenzfrage dienen sollte. Schließlich sollte bei negativem Ausfall der Fluorescenzreaktion mit reinem Ammoniumglycyrrhizinat nach Möglichkeit der die Fluorescenz erzeugende Stoff in möglichst reiner Form aus der Wurzel hergestellt werden.

2. Theoretischer Teil

A. Allgemeines:

Die Abklärung der Fluorescenzfrage bei der Süßholzwurzel veranlaßte uns die Luminescenz-Erscheinungen ganz allgemein eingehend zu studieren. In verschiedenen Arbeiten, deren wichtigste diejenigen von Wawilow & Lewschin²⁰⁹, Pringsheim²¹⁰, Gerngroß²¹¹, Stark²¹², Lenard²¹³, und Kaufmann²¹⁴ sind, konnten nutzbringende Anhaltspunkte erworben werden, vor allem über das Zustandekommen der Fluorescenz und über die Beziehungen zwischen physika-

²⁰⁹ Wawilow & Lewschin: Z. Phys. XXXV 920 (1926).

²¹⁰ Pringsheim: Fluorescenz und Phosphorescenz 3. Aufl. Berlin 160 (1928).

²¹¹ Gerngroß: Ueber die Fluorescenz von Holzstoffen und pflanzlicher Gerbeextrakten Papierfabr. 49 214 (1927).

²¹² Stark: Prinzipien der Atomdynamik, Hirzel 1910—15 bes. Bd. III 202, 246.

²¹³ Lenard: Probleme komplexer Moleküle, Heidelberg I 15 (1914).

²¹⁴ Kaufmann: Beziehung zwischen physikalischen Eigenschaften und chemischer Konstitution, Enke, Stuttgart 265 (1920).

lischer Eigenschaften und chemischer Konstitution. Die Zusammenfassung der wesentlichsten Punkte des Lumineszenz-Studiums ergibt, daß von einem fluoreszierenden Körper folgende Forderungen erfüllt werden müssen:

a) Die Substanz kann anorganischer oder organischer Natur sein.

b) Der Stoff muß ganz allgemein in Lösung vorliegen, wobei das Lösungsmittel unter Umständen auch fest sein kann (Eintrocknen auf Filtrierpapier).

c) Eine Abänderung des Lösungsmittels ändert im allgemeinen Farbe und Intensität der emittierten Fluoreszenz.

d) Die Fluoreszenzfähigkeit aller aromatischer Verbindungen in flüssiger oder fester Lösung nimmt mit wachsender Konzentration stark ab.

e) Die Fluoreszenzintensität scheint nicht vom Dissoziationsgrad des fluoreszierenden Stoffes abhängig zu sein.

f) Als Zentren der Fluoreszenz sind die komplexen Lösungsmoleküle anzusehen.

g) Das Zustandekommen der Fluoreszenz ist oft chemisch bedingt, z. B. Auftreten einer chinoiden Bindung im Pyronring beim Ueberführen des Fluoresceins in Uranin durch Alkalizusatz.

h) Zwischen Fluoreszenz und Molekülbau scheinen enge Beziehungen zu bestehen. Als Ursache des Leuchtens wird das Vorhandensein bestimmter Atomgruppen im Molekül, der sogenannten Chromophore und Fluorophore, angesehen. Die Chromophore bedingen die Farbe des Stoffes und die Fluorophore erst sind imstande, die eingestrahlte und in den Chromophoren absorbierte Lichtenergie als Fluoreszenzlicht auszustrahlen.

i) Bei der Fluoreszenz im ultravioletten Licht sind zur Hauptsache Chromophor und Fluorophor identisch.

k) Der vorzüglichste Chromophor und bei der Fluoreszenz im ultravioletten Licht der vorzüglichste Fluorophor ist der Benzolkern, ganz allgemein geschlossene Ringe und somit aromatische Verbindungen.

l) Substitutionen haben entweder eine Schwächung oder eine Verstärkung der Fluoreszenz zur Folge.

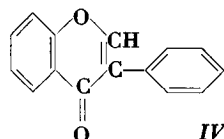
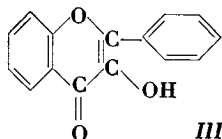
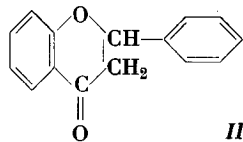
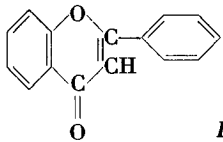
B. Selektionierung der für die Fluoreszenz in Frage kommenden Süßholz-Bestandteile

Bei der Ueberprüfung der Inhaltsstoffe können auf Grund obiger Ausführungen folgende Bestandteile der Droge zum vorneherein als unfähig zur Fluoreszenzerzeugung angesehen und daher von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden: Glukose, Saccharose, Mannit, Stärke, Asparagin, Fette und Gummi. Allen diesen Körpern fehlt eine chromophore oder fluorophore Gruppe oder sie besitzen keine geschlossenen Benzolringe im Molekül. Es kommen somit noch in Frage: Glycyrrhizin, Liquiritin und der chemisch nicht näher untersuchte Harz-Komplex, Bitterstoffe und Gerbstoffe. Diese letztgenannten Stoffe sollen im folgenden näher untersucht werden.

a) **Glycyrrhizin**: ein Triterpenderivat, dessen chemische und physikalische Eigenschaften auf Seite 18 ff bereits in ausführlicher Weise aufgezeigt wurden. Für seine Fluoreszenzfähigkeit spricht einzig die Anhäufung der Benzolringe im Triterpenkern. Die Substitutionen im Aglukon bestehen zur Hauptsache aus einer Karboxyl- und mehreren Alkylgruppen, die beide eine Schwächung einer auftretenden Fluoreszenz zur Folge hätten. Die Bildung des Ammoniumsalzes beruht nicht auf einer chemischen Veränderung des Moleküls in der Weise, daß, ähnlich wie beim Fluorescein-Natrium, eine chinoide Bindung im Ring auftritt. Theoretisch läßt sich daher ableiten, daß weder die freie Glycyrrhizinsäure noch ihre Salze geeignet sind, eine Fluoreszenz-Reaktion auszulösen.

b) **Liquiritin**: ein Flavanon-Glukosid. An dieser Stelle soll etwas ausführlicher auf die chemische Zusammensetzung des Flavanons eingegangen werden, da es zur Erklärung einer eventuellen Fluoreszenzfähigkeit notwendig ist.

Die zahlreichen Pflanzenstoffe, welche sich aus der Flavonreihe ableiten, stellen Polyoxyderivate des Flavons (I) selbst und des Flavanons (II), des Flavonols (III) oder des Isoflavons (IV) dar.



Die Derivate dieser Grundtypen sind, mit Ausnahme derjenigen des Flavanons, Farbstoffe und besitzen infolgedessen eine chromophore Gruppe. Nach Georgiewics²¹⁵ wird ein Körper als Farbstoff bezeichnet, wenn ein Teil des auf ihn eingestrahlten Lichtes absorbiert, der andere Teil reflektiert wird. Es gibt aber auch Körper, die farblos erscheinen und dennoch Lichtstrahlen absorbieren, z. B. ultraviolette Strahlen. Diese Körper besitzen dementsprechend eine den Chromophoren ähnliche Gruppe, welche die eingestrahlte kurzwellige Lichtenergie in langwellige umzuwandeln imstande ist. Solche Gruppen werden zweckentsprechend Fluorophore genannt. Auf die Abkömmlinge der Flavonreihe bezogen bedeutet dies: Derivate des Flavons, des Flavonols und des Isoflavons vermögen sichtbares Licht zu absorbieren und wieder auszustrahlen, weshalb sie Farbstoffe darstellen. Die Derivate des Flavanons dagegen vermögen nur ultraviolettes Licht zu absorbieren und langwelligeres zu reflektieren, wodurch die Fluorescenz zustande kommt. Man könnte daher die im sichtbaren Licht farblos erscheinenden Flavanonabkömmlinge als «Farbstoffe im ultravioletten Licht» bezeichnen.

Für diese Erscheinungen müssen die Chromophore resp. die Fluorophore der betreffenden Verbindungen verantwortlich gemacht werden.

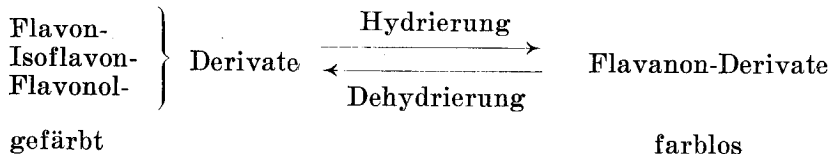
Die chromophore Gruppe in den Flavonfarbstoffen stellt das Pheno- γ -Pyron (I) dar, welches von Bloch & Kostanecki²¹⁶ als Chromon bezeichnet wird. In den Flavanon-Abkömmlingen haben wir die Atomgruppierung (II), welche durch Ab-sättigung des Chromons mit Wasserstoff entstanden ist.



Diese Gruppe im Flavanonmolekül dürfte wohl als Fluorophor angesehen werden. Die Hydrierung bedingt die Zerstörung des Farbstoffcharakters der betreffenden Flavonverbindung, nicht aber die Aufhebung der Fluorescenzfähigkeit, da der wesentlichste Garant für das Zustandekommen der Fluorescenz, der Benzolring, dabei unverändert geblieben ist. In die Sprache der Farbenchemie übersetzt, würde dies bedeuten:

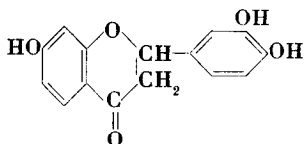
²¹⁵ Georgiewics: Handb. d. Farbenchemie (1922).

²¹⁶ Bloch & Kostanecki: Ber. dtsh. chem. Ges. **33** I 471 (1900).

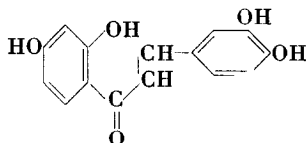


Der Vergleich der beiden Formeln läßt daher die Vermutung zu, daß beim Eintreten einer Doppelbindung in die fluorphore Gruppe des Flavanons ein Chromophor entsteht und daß umgekehrt bei Absättigung des Chromophors der Flavonabkömmlinge mit Wasserstoff ein farbloser Körper hervorgeht. Daß auf alle Fälle die Doppelbindung für den Farbstoffcharakter der Flavonverbindungen von weit größerer Bedeutung ist als der Ringschluß, kann folgendem entnommen werden:

Der Uebergang des farblosen Flavanons Butin (I) in die isomere Chalkonform Butein (II) bedeutet optisch gesprochen die Bildung eines Farbstoffes, chemisch dagegen das Eintreten einer Doppelbindung in die Flavanonform an der gleichen Stelle wie im Chromon, jedoch unter gleichzeitiger Ringöffnung.



Butin (I)



Butein (II)

Das entstandene Oxychalkon, das Butein, ist ein intensiver Farbstoff, da durch die Einführung einer Doppelbindung in den Flavanonring ein Chromophor entstanden ist. Gleichzeitig wurde aber bei der Oxychalkonbildung der wesentlichste Faktor für die Fluorescenz, der Benzolring, zerstört. In gleicher Weise wie Malachitgrün infolge der Anwesenheit einer Doppelbindung eine grüne Farbe, jedoch keine Fluorescenz aufweist, da der Ringschluß im Molekül fehlt, zeigt Rosamin neben der Farbe auch noch eine gelbe Fluorescenz, da sowohl die Doppelbindung als auch der Ringschluß im Rosaminmolekül vorhanden sind.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden:

Das Fehlen der Doppelbindung in der Chromongruppierung beim Flavanon nimmt letztgenanntem Körper die Eigenschaft eines Farbstoffes. Da der Ringschluß jedoch gewahrt blieb,

ist der Körper infolge des Vorhandenseins einer fluorophoren Gruppe fluoreszenzfähig. Der Uebergang des farblosen Flavans in die isomere Oxychalkonform bedingt die Bildung eines Chromophors, jedoch gleichzeitig die Zerstörung des Ringes und damit der Fluoreszenzfähigkeit. Nach dieser Theorie wären demnach Flavonderivate und Oxychalkone Farbstoffe, nicht aber die Flavanonderivate. Fluoreszenzfähig dagegen wären Flavon und Flavanonderivate, nicht aber die Oxychalkone.

Als Substitutionen kommen im Liquiritigenin zwei Hydroxylgruppen vor, welche die Fluoreszenzintensität erhöhen. Alles dies läßt somit die Vermutung aufkommen, daß das Flavanoglucosid der Süßholzwurzel, das Liquiritin, oder ein ihm chemisch verwandter Körper die Fluoreszenz verursache.

c) Harz, Bitterstoff und Gerbstoff:

Diese Stoffe sind nur in geringer Menge in der Droge vorhanden und wurden bis anhin chemisch nicht näher untersucht. Sie fallen daher aus obiger Betrachtung aus. Immerhin wäre es denkbar, daß vor allem der Gerbstoff sich in chemischer Hinsicht nicht wesentlich von den Flavonderivaten unterscheiden würde, besonders wenn es sich dabei um einen Katechin-gerbstoff handeln sollte.

3. Praktischer Teil

A. Herstellung der Reinsubstanzen:

a) Darstellung von reinem primärem Ammoniumglycyrrhizinat: siehe Seite 60.

b) Darstellung von Liquiritin: nach Shinoda & Ueeda²¹⁷.

«Die durch wiederholte Extraktion von Radix Liquiritiae mit Methanol erhaltene Flüssigkeit wurde durch Eindampfen konzentriert; beim Stehen des Konzentrates schied sich das Liquiritin meist bereits in farblosen Kristallen ab. War das nicht der Fall, so wurden 400–800 g 50 %ige Schwefelsäure auf 1 kg Rohmaterial zugesetzt; beim Schütteln setzten sich dann große Mengen Harz ab. Sollte sich auch beim Stehen aus diesen Filtraten kein Liquiritin abscheiden, so muß

²¹⁷ Shinoda & Ueeda: Ber. dtsh. chem. Ges. **67**, I, 436 (1934).

man die harzige Substanz mit heißem Wasser auskochen. Das Liquiritin kristallisiert aus verdünntem Alkohol und heißem Wasser in farblosen Nadeln (Smp. 212 °). Die alkoholische Lösung gibt mit Magnesium und Salzsäure eine violette Färbung.»

Mehrmals wurde mit der Ausgangsdroge und verschiedenen anderen Süßholzsorten versucht nach obiger Darstellungsvorschrift Liquiritin herzustellen, was aber nie gelang. Wir versuchten daher den methanolischen Auszug durch Zusatz von Aether zu reinigen, wodurch zur Hauptsache die Saponine ausgefällt wurden. Die zu einem Trockenextrakt aufgearbeitete Aetherfällung ergab aber bei der quantitativen Bestimmung nur 12 % Glycyrrhizinsäure. Zugleich fiel der Extrakt in verhältnismäßig geringer Menge an, sodaß von der Möglichkeit, auf diesem Wege einen Trockenextrakt herzustellen, abgesehen wurde. Die einzigen Vorteile eines so hergestellten Extractum Liquiritiae siccum waren die nur schwach hellgelbe Färbung sowie die gute Löslichkeit in Wasser. Die Alkohol-Aether-Mutterlauge wurde durch Abdestillieren vorerst vom Aether befreit und hierauf durch weiteres Einengen konzentriert. Die in erwähnter Weise abgeänderte Darstellungsvorschrift für Liquiritin lautet somit:

«500g Süßholzwurzel (IV) werden mit der gleichen Menge Methanol in einem Rundkolben von 5 Lt. Inhalt befeuchtet. Nach einer halben Stunde beschickt man den Kolben mit weiteren 1500 g Extraktionsmittel und zieht die Droge eine halbe Stunde kochend am Rückflußkühler auf dem Wasserbade aus. Dann wird siedend heiß filtriert und das Filtrat beiseite gestellt. Den Rückstand auf dem Filter gibt man in den Kolben zurück und zieht das Drogenpulver mit weiteren 1000 g Extraktionsmittel in gleicher Weise aus. Diese Operation wird noch dreimal wiederholt. Nach völligem Erkalten werden die einzelnen Auszüge durch Filtration vom Defäkationsrückstand befreit und vereinigt. Die vereinigten Filtrate werden auf 1500 g eingedampft und erkalten gelassen. Die nötigenfalls durch Filtration geklärte, methanolische Lösung wird auf einmal mit 3000 g Aether unter Rühren versetzt. Durch Dekantieren wird die überstehende Flüssigkeit von dem sich an der Wandung und auf dem Boden zusammengeballten Niederschlag abgetrennt, auf dem Wasserbade durch Abdestillieren des Aethers und Konzentrieren der alkoholischen Lösung eingengt und zur Kristallisation des Liquiritins in den Eisschrank gestellt. Auch bei erneutem Einengen und wieder Auskristallisierenlassen, konnten nie kristalline Rückstände erhalten werden. Es schied sich stets nur ein harziger Defäkationsrückstand ab. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Vorganges, ohne daß ein Auskristallisieren des Liquiritins erreicht werden konnte, wurde die Mutterlauge zur Trockene eingedampft, um auf diese Weise wenigstens ein an Liquiritin angereichertes Produkt zu erhalten.»

Nach dieser Darstellungsvorschrift wurde geschältes und ungeschältes Süßholz extrahiert. Auch beim Ersetzen des Methanols durch Aethanol konnte in keinem Falle ein Kristallisation von Liquiritin erzielt werden.

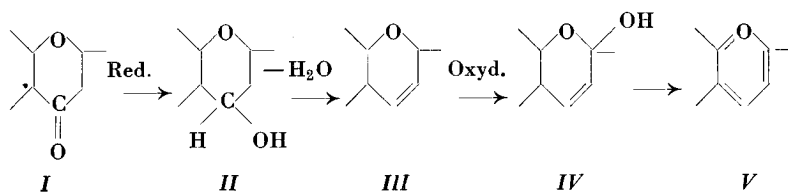
Von einer synthetischen Gewinnung des Liquiritins, resp. des Liquiritigenins wurde aus Zeitmangel abgesehen.

B. Prüfung der dargestellten Präparate

a) Prüfungsvorschriften:

1. Prüfung auf Glycyrrhizin: mit Vanillin und konz. Schwefelsäure: siehe Seite 51.

2. Prüfung auf Liquiritin α) mit Magnesium und konz. Salzsäure: In mehreren Arbeiten über die Flavanon-Glykoside veröffentlichten Asahina & Mitarbeiter²¹⁸ Reaktionen, welche gestatten, Flavanone von Flavonen und Flavonolen zu unterscheiden. Die drei genannten Körper zeigen in bezug auf ihr Verhalten gegen Reduktionsmittel scharfe Unterschiede. So werden die Oxyflavonole nur durch Salzsäure und Magnesium, die Oxyflavone nur durch Natriumamalgam und die Oxyflavanone endlich sowohl durch saure als auch durch alkalische Reduktionsmittel in die roten Flavylumsalze übergeführt. Die Bildung der Flavylumsalze bei der Reduktion der Flavanone mit Magnesium und Salzsäure, geht offenbar wie folgt vor sich: Das Flavanon (I) wird zunächst zu (II) reduziert, welches dann durch H_2O -Abspaltung in die Leukobase (III) übergeht. Die letztere dürfte wohl leicht oxydabel sein und schon durch den Luftsauerstoff zur Karbinolbase (IV) oxydiert werden, die ihrerseits schließlich durch Salzsäure unter Umlagerung das Flavylumsalz (V) liefert.



Diese Farbstoffe der Flavanon-Derivate erwiesen sich als chlorhaltig und verhielten sich den Anthocyanidin-Salzen sehr ähnlich. Die Prüfung auf Liquiritin gestaltet sich daher wie folgt:

²¹⁸ Asahina & Mitarbeiter: Ber. dtsh. chem. Ges. **61** 1646 (1928); **62** 3016 (1929).

«Wenig Substanz wird in einer kleinen Menge 95 Vol.%igem Alkohol gelöst. In die Lösung gibt man Magnesium-Späne und fügt tropfenweise konz. Schwefelsäure hinzu. Dabei tritt bei Anwesenheit von Oxyflavonolen und Oxyflavanonen eine stark violettrote Färbung ein.»

β) mit Eisenchlorid in alkoholischer Lösung.

Eine weitere Differenzierung gestattet das Verhalten des Liquiritins gegenüber alkoholischer Eisenchloridlösung. Sowohl das Glukosid wie das Aglukon geben in alkoholischer Lösung mit Eisenchlorid keine Färbung.

«Wenig Substanz wird in einer kleinen Menge 95 Vol.%igem Alkohol gelöst. Auf Zusatz von wenig verd. Eisenchloridlösung darf bei Anwesenheit von Liquiritin oder Liquiritigenin keine Färbung eintreten.»

3) Prüfung auf den Fluoreszenz erzeugenden Stoff:

Mit der Reaktion von Steiner²¹⁹: siehe Seite 51.

b) Prüfungsergebnisse:

Tabelle 41

Resultate mit reinem, primärem Ammonium-Glycyrrhizinat

mit	Prüfung	auf	Reaktions-Ausfall
Vanillin und konz. Schwefelsäure		Glycyrrhizin	positiv
Magnesium und konz. Salzsäure		Liquiritin	negativ
Eisenchlorid in alkoholischer Lösung		Liquiritin	negativ
10 %iger, wäßriger Kaliumborat-Lösung		Fluoreszenzstoff	negativ

Tabelle 42

Resultate mit dem an Liquiritin angereicherten Rückstand

mit	Prüfung	auf	Reaktions-Ausfall
Vanillin und konz. Schwefelsäure		Glycyrrhizin	negativ
Magnesium und konz. Salzsäure		Liquiritin	positiv
Eisenchlorid in alkoholischer Lösung		Liquiritin	positiv
10 %iger, wäßriger Kaliumborat-Lösung		Fluoreszenzstoff	positiv

²¹⁹ Steiner: Pharm. Acta Helv. 21 364 (1946).

C. Beurteilung der Resultate

Es ließ sich eindeutig feststellen, daß das primäre Ammoniumglycyrrhizinat nicht für das Zustandekommen der Fluoreszenzreaktion in der Süßholzwurzel verantwortlich gemacht werden kann. Das von uns hergestellte Ammoniumglycyrrhizinat stellte ein analysenreines Produkt dar und gab weder die Fluoreszenzreaktion noch diejenige auf Liquiritin. Anders lagen die Verhältnisse bei der Prüfung des mit Liquiritin angereicherten Rückstandes. Die Fluoreszenz-Reaktion wurde positiv erhalten. Da die Prüfung auf Glycyrrhizin negativ ausfiel kann angenommen werden, daß durch die Aetherfällung alles Saponin aus der alkoholischen Lösung entfernt worden ist. Der positive Ausfall der Reduktionsprobe mit Magnesium und konz. Salzsäure beweist das Vorhandensein von Liquiritin. Da aber daneben mit dem Rückstand auch noch eine positive Eisenchlorid-Reaktion erhalten wurde, die vom Liquiritin nicht gegeben wird, scheinen noch Gerbstoffe oder phenolartige Nichtgerbstoffe vorhanden zu sein. Es war daher notwendig, den Rückstand auf Gerbstoffe zu prüfen.

D. Prüfung des mit Liquiritin angereicherten Rückstandes auf Gerbstoffe

nach den von Klein²²⁰ zusammengestellten Vorschriften.

Zur Prüfung wurde eine Stammlösung von 0,8 g Substanz in 100 g Wasser verwendet.

Prüfung auf Gerbstoffe mit:

a) Gelatineprobe:	Trübung	positiv auf Gerbstoffe
b) Bleiazetatprobe:	Fällung	positiv auf Gerbstoffe und phenolartige Nichtgerbstoffe
c) Eisenprobe:	Grünfärbung	positiv auf Katechin-Gerbstoffe
d) Formaldehydprobe:	Fällung	positiv auf Katechin-Gerbstoffe
e) Bromprobe:	sofortige Fällung	positiv auf Katechin-Gerbstoffe
f) Essigsäure-Bleiazetat-Probe:	keine Trübung oder Fällung	negativ auf Gallotannine
g) Schwefelammoniumprobe:	keine Trübung oder Fällung	negativ auf Gallotannine

²²⁰ Klein: Handb. d. Pflanzen-Analyse Bd. III 353 (1932).

Der mit Liquiritin angereicherte Rückstand enthält neben Liquiritin und anderen Stoffen noch Gerbstoff. Und zwar handelt es sich beim Gerbstoff um einen Katechin-Gerbstoff, welcher sehr wahrscheinlich den positiven Ausfall der Eisenchlorid-Reaktion bei der Prüfung auf Liquiritin verursacht.

Da der Rückstand, welcher neben Liquiritin, unter anderem auch noch Katechin-Gerbstoff enthält, eine positive Fluorescenz-Reaktion ergibt, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, ob die Fluorescenz-Reaktion vom Liquiritin, oder vom Katechin-Gerbstoff, oder von beiden verursacht wird. Dies kann erst festgestellt werden, wenn es gelingt, den Katechingerbstoff und das Liquiritin getrennt rein darzustellen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfaßt folgende Punkte:

1. Es wird eine Uebersicht der officinellen Süßholzdrogen, sowie der Pflanzen gegeben, welche glycyrrhizinähnliche Substanzen enthalten. Nach Aufzeigen der verschiedenen Inhaltsstoffe von Radix Liquiritiae wird eingehend der Hauptwirkstoff, das Glycyrrhizin, ferner seine Zugehörigkeit zu den Saponinen, sowie seine Verwendung in den mannigfaltigsten Arzneizubereitungen dargelegt.

2. Es wurde besondere Aufmerksamkeit der qualitativen und quantitativen Prüfung der Ausgangsdroge geschenkt, um die aus dieser untersuchten Droge hergestellten Präparate besser miteinander vergleichen zu können.

3. Die mit verschiedenen Extraktionsmitteln hergestellten Sorten von Glycyrrhizinum ammoniacale wurden ebenfalls einer gründlichen Prüfung unterworfen.

4. Aus Glycyrrhizinum ammoniacale wurde reines, primäres Ammonium-Glycyrrhizinat hergestellt.

5. In der Ausgangsdroge wurde der Glycyrrhizinsäuregehalt nach verschiedenen Bestimmungsverfahren ermittelt.

6. Es wurde versucht, die zum qualitativen Nachweis der Glycyrrhizinsäure dienende Farbreaktion mit Vanillin und konz. Schwefelsäure zu einer kolorimetrischen Methode auszubauen.

7. Anhand von Reinsubstanzen wurden die für das Zustandekommen einer brauchbaren Bestimmungsmethode notwendigen Bedingungen festgelegt und auf Süßholzwurzel und Glycyrrhizinum ammoniacale angewandt.

8. Es wurde neben der kolorimetrischen Bestimmungsmethode für Glycyrrhizinsäure noch ein gravimetrisches Verfahren entwickelt, welches das Glycyrrhizin ebenfalls als Aglukon bestimmt.

9. Die Aufsuchung des die Fluorescenz erzeugenden Stoffes in der Süßholzwurzel ergab, daß es sich dabei nicht um das Monoammonsalz der Glycyrrhizinsäure handeln kann. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, daß die in der Süßholzwurzel vorhandenen Gerbstoffe, Katechingerbstoffe darstellen, welche mit dem Flavanon-Glukosid, Liquiritin, chemisch verwandt sind. Es besteht die Möglichkeit, daß einer dieser beiden Stoffe die Fluorescenz verursacht.

Curriculum vitae

Am 2. April 1920 wurde ich als Sohn des Apothekers Bruno Wiest und dessen Ehefrau Barbara, geb. Süß, in Oberägeri, Kt. Zug, geboren. Dasselbst besuchte ich die Volksschule und kam mit 12 Jahren an die Jesuitenschule in Feldkirch, wo ich 5 Jahre lang das Gymnasium besuchte. Nach Absolvierung der letzten zwei Gymnasialklassen an der Kantonsschule in Zug bestand ich im Sommer 1939 die Maturitäts-Prüfung Typus A. Im Herbst desselben Jahres begann ich das Pharmaziestudium an der Universität in Freiburg und setzte dasselbe, nach der vorgeschriebenen Praktikanten- und Assistentenzeit, an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich zu Beginn des Sommers 1944 fort. Im Frühling 1946 schloß ich den fachwissenschaftlichen Teil des Studiums mit dem Staatsexamen ab. Seit dieser Zeit war ich als Assistent von Herrn Prof. Dr. J. Büchi an der pharmazeutischen Abteilung der ETH tätig. Während dieser Zeit entstand unter seiner Leitung die vorliegende Arbeit.

Zürich, den 31. Juli 1948.