

Papierchromatographischer Nachweis verschiedener Zucker und spektro- photometrische Bestimmung des Glykogens in Extrakten von Glossinen, Reduviiden und "Ornithodoros moubata"

Autor(en): **Wyss-Huber, M. / Striebel, H. / Weiss, E.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **18 (1961)**

Heft 1

PDF erstellt am: **29.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-310937>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Papierchromatographischer Nachweis verschiedener Zucker und spektro-photometrische Bestimmung des Glykogens in Extrakten von Glossinen, Reduviiden und *Ornithodoros moubata*.

Von M. WYSS-HUBER, H. STRIEBEL, E. WEISS und R. GEIGY*.

a) *Nachweis von Zuckern.*

WYATT (vgl. GEIGY et al., 1959) führte quantitative Bestimmungen von Trehalose und Glucose in Extrakten von ganzen Fliegen, Därmen und Speicheldrüsen der Tsetsearten *Glossina morsitans* und *Glossina brevipalpis* durch. Die im Vergleich zu andern Insekten (WYATT & KALF, 1957; HOWDEN & KILBY, 1956; EVANS & DETHIER, 1957), wo Trehalose im Blut in Konzentrationen von 100—3000 mg/100 ml vorkommt, relativ niedrigen Werte von maximal 19 mg Trehalose und 17 mg Glucose in 100 mg Gewebe ließen es wünschenswert erscheinen, papierchromatographisch dieselben Extrakte sowie vergleichsweise solche der Reduviiden *Rhodnius prolixus* und *Triatoma infestans* und der Zecke *Ornithodoros moubata* auf das Vorkommen weiterer Zucker hin zu untersuchen.

Fixierung des Untersuchungsmaterials.

Das Tsetsematerial (ganze Fliegen, isolierte Därme und Speicheldrüsen) wurde lebendfrisch in Ifakara (Tanganyika) in 70% Alkohol bei 70°C fixiert (GEIGY et al., 1959) und bis zur Untersuchung in Basel im Kühlschrank bei 0° aufbewahrt.

Ornithodoros moubata-Nymphen und Adulttiere, sowie *Rhodnius prolixus* und *Triatoma infestans* stammen aus Zuchten des Tropeninstituts Basel und wurden ebenfalls lebendfrisch in heißem 70% Alkohol fixiert.

Aufarbeitung der Extrakte.

Nach den Angaben von WYATT (GEIGY et al., 1959) wurden die Gewebe oder zerschnittenen Insekten im Mörser zerrieben, dann

* Diese Arbeit ist in dankenswerter Weise vom Schweizerischen Nationalfonds dotiert worden.

Den Herren Professoren T. REICHSTEIN und C. GROB danken wir herzlich dafür, daß sie uns für diese Untersuchungen in der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel einen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt haben.

bei 70° C mit der Fixierungsflüssigkeit und anschließend 2mal erneut mit 70% Alkohol extrahiert. Die alkoholischen Lösungen wurden vereinigt und im Vakuum bei 55° C (Geigy et al., 1959) eingedampft. Die Gewichte der Rückstände sind in Tab. 3 angegeben.

Vorversuche mit Galleria-, Mehlmotten- und Triatoma-Extrakten ergaben im Pchr¹ eine über die ganze Laufstrecke verteilte, den Nachweis mit Partridge-Reagens stark störende Fluoreszenz, wenn die Rückstände der eingedampften Alkoholextrakte in Wasser gelöst und direkt auf das Papier aufgetragen wurden. Zur vollständigen Entfernung dieser fluoreszierenden Stoffe waren Extraktion mit Chf-Alk-(3:2) und Reinigung des rohen Zuckergemisches an Kohle-Celite-(1:1) notwendig.

Zur Reinigung der Extrakte mit Chf-Alk-(3:2) und mit Kohle-Celite-(1:1) wurden folgende Vorversuche ausgeführt:

a) Ein Gemisch von je 10 γ L, M, S, G, F und Ga wurde an einer Säule von 1 g Kohle-Celite-(1:1) chromatographiert, um die Mengen der später eluierten Zucker mit denjenigen des Ausgangsgemisches zu vergleichen. Verwendet wurde Aktiv-Kohle Merck pro analysi.

TABELLE 1.

Chromatographie von je 10 γ L, M, S, G, F, Ga an 1 g Kohle-Celite-(1:1).

eluiert mit	im Pchr gefundene Zucker
5 ml W	—
5 ml 7,5% Alk	G, Ga, F
5 ml 15% Alk	L, M, S, Spuren von Ga und G
5 ml 30% Alk	Spuren von L

Wie Tab. 1 zeigt, wurden die Monosaccharide in der 7,5%-Alkohol-Fraktion, die Disaccharide praktisch vollständig in der 15%-Fraktion gefunden. Bei 30% Alk zeigt das Pchr nur noch einen mit Partridge-Reagens kaum sichtbaren Fleck von L (weniger als 1 γ).

In einem zweiten Vorversuch wurde nunmehr Mehlmotten-Raupen-Extrakt unter Beigabe eines analogen Zuckergemisches zuerst mit Chf-Alk-(3:2) extrahiert und dann an Kohle-Celite chromatographiert, um festzustellen, ob die fluoreszierenden Stoffe zurückgehalten werden. Man ging folgendermaßen vor:

¹ Verwendete Abkürzungen: Alk = Aethylalkohol, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Dmf = Dimethylformamid, Me = Methanol, W = Wasser, A = Arabinose, F = Fructose, G = Glucose, Ga = Galactose, L = Lactose, M = Maltose, S = Saccharose, T = Trehalose, Pchr = Papierchromatogramm.

b) Zu 11,0 mg Alkohol-Extrakt von Mehlmotten-Raupen (entsprechend 200 mg Raupen-Frischgewicht) wurden je 5 γ G, Ga, F, L, M, S, T zugesetzt. Das Gemisch wurde in 0,4 ml 5% Na_2SO_4 -Lösung gelöst und 5mal mit 1,6 ml Chf-Alk-(3:2) extrahiert. Die Chf-Alk-Lösungen wurden mit 0,4 ml Na_2SO_4 -Lösung gewaschen. Die vereinigten Chf-Alk-Lösungen wurden eingedampft; Gewicht = 5,2 mg. In den wäßrigen Lösungen wurde das Na_2SO_4 durch Zugabe der gleichen Menge Alk ausgefällt. Die überstehende Lösung wurde abgegossen, der Na_2SO_4 -Niederschlag noch 2mal in W gelöst und erneut mit Alk ausgefällt. Die alkoholischen Lösungen wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Gewicht = 12,1 mg. Dieser Rückstand enthielt immer noch einen Teil der fluoreszierenden, störenden Stoffe. Er wurde in wenig W gelöst und auf eine Säule von der 40fachen Menge Kohle-Celite-(1:1) aufgetragen.

TABELLE 2.

Chromatographie von 12,1 mg rohem Zuckergemisch an 0,5 g Kohle-Celite-(1:1).

eluiert mit	Gewicht
10 ml W	8,4 mg
10 ml 7,5% Alk	0,4 mg
10 ml 15% Alk	0,8 mg

Die Fraktionen wurden vereinigt und quantitativ auf ein Pchr übertragen. Entwicklung im System Dmf-Bu-W-(1:4:1), 24 h. Wie in einer früheren Publikation (WYSS-HUBER et al., 1960) ausführlich beschrieben, wurde die Zone der Monosaccharide mit Partridge besprüht und G, Ga und F nachgewiesen. Die Disaccharide wurden aus dem Papier extrahiert, mit Trehalase behandelt und anschließend im Pchr aus T entstandene G sowie L, S, M nach Besprühen mit Partridge- H_3PO_4 -Reagens (Partridge-Reagens mit 6% sirupöser H_3PO_4) gefunden.

Die Vorversuche a) und b) zeigten, daß mit Reinigung der Alkohol-Extrakte an Kohle-Celite-(1:1) nach vorausgegangener Extraktion mit Chf-Alk-(3:2) eine gute Abtrennung der fluoreszierenden Verunreinigungen erhalten wird. In Mengen von 5 γ zugesetzte Zucker waren anschließend im Pchr sehr gut feststellbar.

Die Rückstände der alkoholischen Insektenextrakte wurden in den in Tab. 3 angegebenen Mengen 5% Na_2SO_4 -Lösung aufgenommen und 6—8mal mit der vierfachen Menge Chf-Alk-(3:2) extrahiert. Die Chf-Alk-(3:2)-Lösungen wurden mit einer zweiten, gleichen Menge Na_2SO_4 -Lösung gewaschen. Um bei den kleinen

TABELLE 3.

Tierart	Anzahl	Organ	Frischgewicht mg	Alk. Extr. mg	gelöst in x ml 5 % Na ₂ SO ₄ - Lösung	Chf- Alk- (3:2) Extr. mg	rohes Zucker- gemisch mg	Chromatogr. an Kohle- Celite- (1:1) Fraktionen in mg	1.Pchr. Mono- sac- charide	fermen- tiertes Zucker- gemisch mg	2.Pchr. Disac- charide + G aus T
G. mors.	256	total I	5740	407,6	5	280,8	105,5	W 57,5 15 % 15,3 30 % 8,2	G,A	39 7,5	G G
G. mors.	53	total II	1260	58,3	1	23,7	67,1	W 60,4 15 % 3,3 30 % 3,0	G,(A)	1,8 1,1	G G
G. mors.	128	Darm*	270 ⁺	23,8	1	21,4	32,7	W 29,7 15 % 1,2 30 % 0,5	G,A	2,0 1,9	G,S -
G. mors.	764	Darm	1434 ⁺	95,4	2	45,1	64,2	W 51,8 15 % 2,5 30 % 2,4	G,A	2,2 2,0	G,(S) G
G. mors.	780	Spdr.*	66 ⁺	46,8	1	9,8	50,9	W 46,3 15 % 0,3 30 % 0,2	G,A	1,4 1,6	G,S G
G. mors.	3474	Spdr.	336 ⁺	305,7	1,5	66,4	121,0	W 106,2 15 % 2,7 30 % 1,6	G,A	2,1 1,5	G,S -
G. brev.	59	Darm*	336 ⁺	36,6	1,5	27,9	81,7	W 73,1 15 % 1,1 30 % 0,2	G,A	2,1 1,2	G,S G
G. brev.	40	Darm	186 ⁺	14,2	1	15,4	27,9	W 24,7 15 % 0,2 30 % 0,2	G,A	1,8 1,2	G,S (G)
G. brev.	59 99	Spdr.* Spdr.	18 ⁺ 30	7,0 6,2	1,5	7,1	23,9	W 17,9 15 % 0,1 30 % 0,1	G,A	2,1 1,2	G,S G
O. moub. Nymphen	650	total	5040	229,2	5	95,2	75,8	W 48,1 15 % 4,8 30 % 2,0	G	3,2	G
O. moub. adult	710	total	15190	751,2	5	263,5	125,4	W 72,4 15 % 6,2 30 % 3,1 30 % 4,2 60 % 2,8	G,F? G - -	2,1 2,8 2,4	- G -
Rh. prol. adult	32	total ohne Darm	2290 fix.	353,3	1,6	235,9	40,0	W 18,4 15 % 3,2 30 % 18,4	G,F?	2,1	G
Rh. prol. Nymphen + Larven	19	total	290	33,4	2	26,2	11,4	W 1,0 15 % 0,1 30 % 0,2	G,F?	0,6	G
Rh. prol. adult	43	Darm	576,8	86,6	2	47,5	19,7	W 6,3 15 % 2,8 30 % 1,0	G	2,0	G,S?
Triatoma infestans	19	Darm	549,2	69,3	2	46,5	17,8	W 3,0 15 % 0,2 30 % 0,7	G,F?	1,9	G

* = fixiert mit Zusatz von einigen Tropfen NH₃ zum 70 % Alkohol

+ = berechnet: fix. Gew. = 1,20 = Frischgewicht

Pchr: Whatman No. 1; System: Dmf-Bu-W-(1:4:1), 36 h

Substanzmengen Verluste möglichst weitgehend zu vermeiden, erwies es sich als günstig, die Na_2SO_4 -Lösungen in Zentrifugen-gläsern mit der Chf-Alk-(3:2)-Lösung während 3 Min. gut zu mischen und anschließend durch Zentrifugieren eine saubere Trennung der beiden Schichten zu erlangen. Die Chf-Alk-Lösungen wurden jeweils mit einer feinen Pipette sorgfältig abgesaugt, vereinigt und im Vakuum eingedampft; Gewichte der Rückstände in Tab. 3 [Chf-Alk-(3:2)-Extrakt]. Zur Na_2SO_4 -Lösung (Zuckerlösung und Waschlösung) wurde das gleiche Volumen Alk zugegeben und der Na_2SO_4 -Niederschlag abzentrifugiert. Nach Abgießen der überstehenden Lösung wurde er noch 2mal in Wasser gelöst und jeweils erneut mit Alkohol ausgefällt. Die vereinigten alkoholischen Lösungen wurden im Vakuum eingedampft; Gewicht der Rückstände in Tab. 3 (rohes Zuckergemisch). Na_2SO_4 konnte meist nicht vollständig entfernt werden, was die relativ hohen Gewichte erklärt.

Zur weitem Reinigung wurden die rohen Zuckergemische wie im Vorversuch an der 40fachen Menge Kohle-Celite-(1:1) chromatographiert und mit W, Alk 15% und Alk 30% in je der 5fachen Menge des Kohlegemisches eluiert.

Tab. 3 gibt die Gewichte der einzelnen Fraktionen. Die Wasserfraktion wurde nicht weiter untersucht, da sie in Vorversuch a) keine Zucker enthielt. In der 15% Alk-Fraktion war nach den Ergebnissen dieses Versuches die Hauptmenge der Zucker zu erwarten. Diese Fraktion wurde nach Eindampfen und Lösen in 0,005 ml Me meist quantitativ auf ein Pchr übertragen und 24 bis 36 h im System Dmf-Bu-W-(1:4:1) entwickelt². Wie in einer früheren Arbeit ausführlich beschrieben (WYSS-HUBER et al., 1960), wurde die an Hand von in den Randstreifen des Pchr mitgelaufenen Kontrollzuckern bestimmte Monosaccharidzone mit Partridge-Reagens entwickelt. Die Disaccharide wurden aus dem Papier extrahiert und mit Trehalase fermentiert. Fermentierungslösung: 0,03 ml Trehalase aus *Galleria*-Raupen (KALF & RIEDER, 1958), 0,12 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,5); Dauer der Fermentierung: 12 h bei 37° C. Im Gegensatz zur früher veröffentlichten Methode wurde das Zuckergemisch nach Ausfällung des Fermentes durch Zugabe des 5fachen Volumens Alk nicht direkt auf ein zweites Pchr übertragen. Mit dem *Galleria*-Ferment wurden dem gereinigten Extrakt wiederum in geringer Menge fluoreszierende Verunreinigungen zugesetzt. Um diese zu entfernen, wurde das ferment-

² In einzelnen Fällen (*G. mors.* total II, *G. mors.* Darm und Speicheldrüsen) wurden 2 Pchr laufen gelassen; bei *G. mors.* total II im eben genannten System, bei den beiden andern Extrakten im System Bu-Essigsäure-W-(4:1:5, org. Phase).

tierte Zuckergemisch (Gewicht in Tab. 3) nach Ausfällung des Fermentes in der üblichen Weise erneut an der 40fachen Menge Kohle-Celite-(1:1) chromatographiert. Zur Herstellung sehr kleiner Kohle-Celite-Säulen (24—128 mg) wurden Trichter mit möglichst engem Hals von 2—3 mm ϕ verwendet. Über einem Wattepfropfen wurde das Kohle-Celite-Gemisch in den Trichterhals eingefüllt. Eluiert wurde wiederum mit je der 5fachen Menge des Kohle-Celite-Gemisches von W, Alk 15% und Alk 30%. Die 15%-Fraktion wurde eingedampft, in 0,005 ml Me gelöst und quantitativ auf ein Pchr übertragen. Entwicklung des Pchr im System Dmf-Bu-W-(1:4:1), 24—36 h. Mit Partridge-Reagens, dem 6% sirupöse H_3PO_4 zugesetzt worden war (vgl. WYSS-HUBER et al., 1960), wurden auf diesem Pchr aus T bei der Fermentierung entstandene G sowie die übrigen Disaccharide nachgewiesen.

Die 30%-Fraktion des ersten Kohle-Celite-(1:1)-Chromatogrammes wurde direkt fermentiert, da in ihr nach den Resultaten von Vorversuch a) keine Monosaccharide mehr zu erwarten waren. Wie oben wurde das fermentierte Gemisch (Gewicht in Tab. 3) an Kohle-Celite-(1:1) gereinigt und die dabei gewonnene 15% Alk-Fraktion in derselben Weise im Pchr mit Partridge- H_3PO_4 -Reagens untersucht.

Resultate.

Alle Glossinen-Extrakte enthalten G und ein zweites Monosaccharid, das im System Dmf-Bu-W-(1:4:1) sowie in Bu-Essigsäure-W-(4:1:5, organische Phase) die gleiche Laufstrecke zeigt wie Arabinose. Mit Partridge-Reagens ohne H_3PO_4 -Zusatz gibt dieser Zucker die für Aldopentosen charakteristisch rotbraune Färbung und Fluoreszenz (PARTRIDGE, 1949) in derselben Weise wie authentische A. Die 3 andern Aldopentosen (Ribose, Xylose und Lyxose) laufen in beiden Systemen deutlich weiter als A. A dürfte in mindestens denselben, wenn nicht in höheren Konzentrationen als G in den Extrakten vorhanden sein, da der entsprechende Fleck im Pchr immer gleich deutlich oder sogar intensiver war als derjenige von G. In Versuchen mit reinen Zuckern war die Partridge-Reaktion für A gleich empfindlich wie für G (0,5 γ G und A sind noch deutlich nachzuweisen).

Alle Glossinen-Extrakte enthielten T, die im zweiten Pchr nach der Fermentierung mit Trehalase als G eindeutig festzustellen war. In allen Glossinen-Organ-Extrakten tritt ferner ein Zucker auf, der in beiden Systemen (Dmf-Bu-W-(1:4:1) und Bu-Essigsäure-W-(4:1:5, organische Phase) im Pchr gleich weit läuft wie Saccharose und mit Partridge- H_3PO_4 ebenfalls deutlich positiv reagiert.

In den Extrakten von ganzen Glossinen waren G, A und T zu finden. Im Vergleich zu den relativ großen Mengen Ausgangsmaterial fielen jedoch die Zuckerreaktionen im Pchr schwächer aus als bei Organextrakten. S war in Extrakten von ganzen Fliegen überhaupt nicht festzustellen. Dies könnte durch eine ungenügende Fixierung dieser Präparate bedingt sein, obschon auch diese Tiere lebendfrisch in heißen 70% Alkohol hinein zerschnitten wurden.

Versuche mit Totalextrakten von *Ornithodoros moubata*-Adulttieren und -Nymphen, von *Rhodnius prolixus*-Adulttieren und -Nymphen sowie mit Darmextrakten von *Rhodnius prolixus* und *Triatoma infestans* ergaben als interessantes Resultat, daß nicht nur in den beiden Heteroptera, sondern auch in den Zecken T vorkommt. In allen Extrakten wurde G gefunden, in einzelnen (*O. moubata* adult, *Rh. prolixus* Totalextrakt, *Rh. prolixus* und *T. infestans* Darm) ein Zucker, der mit Partridge-Reagens nur sehr schwach reagierte und eine gleiche Laufstrecke wie F zeigte.

Diskussion.

Der Vergleich der Glossinen-Präparate mit allen übrigen Extrakten zeigt, daß einzig in der Tsetsefliege ein Zucker zu finden ist, der nach Laufstrecke im Pchr in 2 verschiedenen Systemen sowie nach der Reaktion mit Partridge-Reagens mit A identisch sein dürfte. In der Literatur konnte einzig in der Arbeit von SISAKIAN & WEINOWA (1958) ein Hinweis auf das Vorkommen von A in Insekten gefunden werden. Die beiden russischen Autoren isolierten aus Coelomflüssigkeit von Puppen des Seidenspinners *Bombyx mori* einen Komplex, den sie in zwei Fraktionen aufteilten. Die eine davon enthält verschiedene Aminosäuren sowie G, Mannose und A neben einem nicht identifizierten Kohlehydrat mit $R_F = 0,09$, GALUN und FRAENKEL (1957) fanden bei *Aedes aegypti*, *Sarcophaga bullata* und *Musca domestica* in Überlebensversuchen, daß A für diese Insekten keinen Nährwert besitzt und daß sie, neben andern Zuckern, auf *Musca domestica* eine Repellent-Wirkung ausübt und auch toxische Effekte zeigt.

Möglicherweise erklärt das Vorhandensein von A in den Glossinen-Extrakten in schätzungsweise recht hohen Mengen, daß die von WYATT (vgl. GEIGY et al., 1959) gefundenen Werte für T und G, im Verhältnis zu an anderen Insekten gewonnenen Resultaten, sehr niedrig liegen.

Es wird notwendig sein, die papierchromatographisch festgestellten Zucker A, G, T und S quantitativ zu bestimmen, sowie eine mögliche Beeinflussung der in Kultur gehaltenen Trypanosomen durch A, wie sie durch T ausgeübt wird, zu untersuchen.

b) *Bestimmung des Glykogens.*

Da WYATT (vgl. GEIGY et al., 1959) bei seinen quantitativen Bestimmungen von T und G in den Geweben der Tsetsefliege nur geringe Mengen dieser Zucker vorfand, stellte sich unter anderm auch die Frage, ob möglicherweise Glykogen das wichtigste und am meisten vorkommende Kohlehydrat in den Glossinen darstellt. Dies wurde nun im Zusammenhang mit dem papierchromatographischen Nachweis der verschiedenen Zucker mittels spektro-photometrischer Bestimmungen abgeklärt.

Aufarbeitung des Materials.

Das für den Zuckernachweis verwendete Material diente nach der dreimaligen Extraktion mit heißem 70% Alkohol auch für den Glykogennachweis. Vorerst wurden die Gewebe ein viertes Mal mit 70% Alkohol extrahiert. Dieser Extrakt wurde darauf im Vakuum auf 1,5 ml bzw. bei geringen Gewebemengen auf 0,75 ml eingengt und anschließend mit Hilfe der Anthron-Reaktion nach KAHAN (1953) auf noch evtl. vorhandene Zucker untersucht (vgl. auch MORRIS, 1948). In sämtlichen Fällen zeigte sich, daß die Zucker in den vorangegangenen 3 Extraktionen quantitativ aus den Geweben entfernt worden waren, da der 4. Extrakt mit dem Anthron-Nachweis keinerlei Farbreaktion ergab. Somit war bei der nachfolgenden Glykogenbestimmung zu erwarten, daß die Farbreaktionen mit dem Anthron-Reagens nur vom Glykogen herührten und die Resultate nicht durch unvollständig entfernte Zucker verfälscht werden konnten.

Nach diesem Vorversuch wurden die Gewebe oder die zerriebenen ganzen Insekten nach der Methode von KAHAN mit 5%iger Trichloressigsäure extrahiert, wobei pro 200 mg Gewebe 1 ml verwendet wurde (bei ganz kleinen Mengen jedoch nur 0,5 ml). Zur Entfernung von Eiweißspuren oder phosphorylierten Zwischenprodukten wurden pro 1 ml Extrakt 0,2 ml 0,3 N Ba(OH)₂ zugesetzt und anschließend zentrifugiert. Noch vorhandenes Ba⁺⁺ wurde aus der überstehenden Lösung mit 0,3 ml 5% ZnSO₄ ausgefällt und der entstandene Niederschlag wiederum durch Zentrifugieren entfernt. Durch dieses Vorgehen wurde ein Extrakt erhalten, dessen Volumen 1,5 ml oder ein ganzzahliges Mehrfaches davon betrug. Dadurch wurden die Anthron-Reaktion und die nachherige Berechnung des Glykogengehaltes sehr vereinfacht, da nach der Vorschrift von KAHAN genau 1,5 ml Flüssigkeit für die Anthron-Reaktion benötigt werden.

Bei den weitem Untersuchungen wurden von den Extrakten je 1,5 ml (bei geringen Gewebemengen 0,75 ml) mit 0,5 ml (0,25 ml)

Anthron-Reagens (2% Anthron in Essigsäureäthylester) versetzt und anschließend aus einer graduierten Bürette 6 ml conc. Schwefelsäure zugetropft, wobei der Extrakt mit dem Anthron-Reagens dauernd geschüttelt wurde. Es mußte darauf geachtet werden, daß dieser Schritt immer gleichartig ausgeführt wurde, da dies nach KAHAN für die Uniformität der Reaktion außerordentlich wichtig ist. Nach der vollständigen Durchmischung von Extrakt und Schwefelsäure wurde während 3 Min. auf dem kochenden Wasserbad erwärmt. Nach 15 Min. konnte die resultierende Farbe im Spekto-Photometer gegenüber einer Cuvette, enthaltend 1,5 ml 5% Trichloressigsäure, 0,5 ml Anthron-Reagens und 6 ml conc. H_2SO_4 bei einer Wellenlänge von 625 $m\mu$ abgelesen werden. Mit Hilfe der Eichkurve, die durch bekannte Glykogenlösungen erhalten und halblogarithmisch aufgezeichnet worden war, ließen sich die Glykogenmengen in den Extrakten bestimmen.

Stand mehr als 1,5 ml Extrakt zur Verfügung, so wurde der Rest, der immer ein ganzzahliges Vielfaches von 1,5 ml betrug, auf 1,5 ml eingeeengt und damit anschließend eine zweite Anthron-Reaktion durchgeführt und die Konzentration von Glykogen bestimmt. So ergab sich bei Gewebemengen über 200 mg eine Kontrollmöglichkeit, welche die ersten Resultate bestätigte.

Resultate.

Alle untersuchten Gewebe enthielten mehr oder weniger Glykogen. Beim Glossinen-Material wurden nur kleine Mengen von Glykogen gefunden, und zwar im allgemeinen rund 2 mg/100 g Gewebe. Eine einzige Ausnahme bildeten isolierte Därme von *G. brevipalpis*. Dieses Material enthielt 6,45 mg Glykogen pro 100 g Gewebe (Tab. 4). Es scheint deshalb, daß das Glykogen wohl in der ganzen Tsetsefliege verteilt in sehr geringen Mengen vorkommt, daß aber keine eigentlichen Speicherorgane bestehen.

Für die Reduviiden liegen die Verhältnisse anders. Sowohl *Rhodnius* als auch *Triatoma* zeigen im Darm stark erhöhte Glykogenkonzentrationen von 17,34 mg bzw. 20,76 mg pro 100 g Gewebe. Der Extrakt von ganzen *Rhodnius*, denen jedoch der Darm entfernt worden war, ergab einen Glykogengehalt von nur 0,93 mg pro 100 g Gewebe. Demnach dürfte das Glykogen bei *Rhodnius* hauptsächlich im Darm gespeichert sein. Bei *Triatoma* ist dies weniger ausgeprägt, da Tiere ohne Darm immerhin noch 8,86 mg/100 g Gewebe enthalten.

Bei der Zecke *Ornithodoros moubata* wurden nur ganze Tiere untersucht. Für adulte Tiere und für Nymphen war der Glykogengehalt derselbe. Er entspricht mit 7,31 mg/100 g Gewebe bzw.

TABELLE 4.
Glykogenkonzentration in den verschiedenen Geweben.

Tierart	Organ	Anzahl	Frischgewicht mg	Glykogen in mg/100 g Gewebe
G. mors.	total I	256	5740	1,50
G. mors.	total II	53	1260	2,86
G. mors.	Darm*	128	270 ⁺	1,85
G. mors.	Darm	764	1434 ⁺	2,09
G. mors.	Spdr.*	780	66 ⁺	2,27
G. mors.	Spdr.	3474	336 ⁺	2,53
G. brev.	Darm*	59	336 ⁺	2,50
G. brev.	Darm	40	186 ⁺	6,45
G. brev.	Spdr.	59	15 ⁺	2,22
O. moub. Nymphen	total	650	5040	7,34
O. moub. Adult	total	710	15190	7,31
Rhod. prol. Adult	total ohne Darm	32	2290 fix.	0,93
Rhod. prol. Nymphen + Larven	total	19	290	6,90
Rhod. prol. Adult	Darm	43	576,8	17,34
Triatoma infestans	total ohne Darm	21	4302	8,86
Triatoma infestans	Darm	19	549	20,76

* = fixiert mit Zusatz von einigen Tropfen NH₃ zum 70 % Alkohol

+ = berechnet: fix. Gew. = 1,20 = Frischgewicht

7,34 mg/100 g Gewebe demjenigen von *Rhodnius*-Nymphen (Tabelle 4).

Diskussion.

Der Vergleich der Glossinen-Präparate mit allen übrigen Extrakten zeigt für die Tsetsefliegen einen geringen Glykogengehalt. Da zudem WYATT (GEIGY et al., 1959) verhältnismäßig nur sehr wenig Glukose und Trehalose in Glossinen gefunden hat, andererseits aber Arabinose in relativ großen Mengen vorzukommen scheint, stellt sich die Frage, ob der Kohlehydratstoffwechsel der Glossinen von demjenigen anderer Insekten wesentlich abweicht, da ja Arabinose eine Aldopentose darstellt. Jedenfalls hat sich die Vermutung WYATTS nicht bestätigt, wonach Glykogen das wichtigste Kohlehydrat im Stoffwechsel der Tsetsefliege darstellen könnte.

Im Folgenden wird es notwendig sein, die Wirkung von Glykogen, Arabinose und Trehalose auf Kultur-Trypanosomen einzeln und kombiniert zu prüfen.

Literatur.

- EVANS, D. R. & DETHIER, V. G. (1957). The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. — *J. Insect Physiol.* 1, 3-17.
- GALUN, R. & FRAENKEL, G. (1957). Physiological effects of carbohydrates in the nutrition of a mosquito, *Aedes aegypti* and two flies, *Sarcophaga bullata* and *Musca domestica*. — *J. cell. comp. Physiol.* 50, 1-23.
- GEIGY, R., HUBER, M., WEINMAN, D. & WYATT, G. R. (1959). Demonstration of trehalose in the vector of african trypanosomiasis: the tsetse fly. — *Acta tropica* 16, 255-262.
- HOWDEN, G. F. & KILBY, B. A. (1956). Trehalose and trehalase in the locust. — *Chem. and Ind.*, 1453-54.
- KAHAN, JOHN. (1953). A rapid photometric determination of Glycogen. — *Arch. Biochem. Biophys.* 47, 408-418.
- KALF, G. F. & RIEDER, S. V. (1958). The purification and properties of Trehalase. — *J. Biol. Chem.* 230, 691-698.
- MORRIS, D. L. (1948). Quantitative determination of Carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent. — *Science* 107, 254-255.
- PARTRIDGE, S. M. (1949). Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. — *Nature* 164, 443.
- SISAKIAN, N. M. & WEINOWA, M. K. (1958). A compound complex isolated from the coelomic fluid of pupae of the silkworm (*Bombyx mori*). — *Biokhimiia* 23, 48-54.
- WYATT, G. R. & KALF, G. F. (1957). The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates. — *J. gen. Physiol.* 40, 833-47.
- WYSS-HUBER, M., JAEGER, HERB. & WEISS, EK. (1960). Nachweis kleiner Mengen Trehalose und verwandter Zucker in einem Gemisch. — *Helv. chim. Acta XLIII*, 1010-1013.

Résumé.

En utilisant la chromatographie sur papier, on a trouvé, dans les extraits de mouches tsétsé entières, ainsi que dans des extraits d'intestins et de glandes

salivaires isolés des espèces *Glossina morsitans* et *Glossina brevipalpis*, deux saccharides : la tréhalose et le glucose. Par ailleurs, on a décelé la présence de deux autres sucres, probablement identiques à l'arabinose et au saccharose. Dans les extraits d'*Ornithodoros moubata*, de *Rhodnius prolixus* et de *Triatoma infestans*, on a également démontré la présence de tréhalose, de glucose et probablement de fructose, par contre, on n'a jamais trouvé ni d'arabinose, ni de saccharose.

Après extraction des différents sucres, on a utilisé le même matériel pour déterminer par voie spectro-photométrique la concentration de glycogène dans les tissus. Ces mesures quantitatives ont donné, pour tout le matériel des mouches tsétsé, des quantités minimales de glycogène, soit en moyenne 2 mg pour 100 g de tissu. Par contre, chez *Ornithodoros moubata*, *Rhodnius prolixus* et *Triatoma infestans*, on trouve des quantités de glycogène plus élevées. Chez les deux espèces de Réduvidés, le glycogène s'accumule probablement dans l'intestin. On constate en effet que les insectes privés d'intestin contiennent beaucoup moins de glycogène que les individus complets, alors que, dans les intestins isolés de *Rhodnius prolixus* et *Triatoma infestans*, on trouve beaucoup plus de glycogène que dans les insectes entiers.

Summary.

Extracts of whole tsetse-flies as well as of isolated guts and salivary glands were tested by paperchromatography for sugars. In the species of *Glossina morsitans* and *Glossina brevipalpis* four saccharides, namely trehalose, saccharose, glucose and arabinose were found. In the extracts of *Ornithodoros moubata*, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* studied with the same methods the presence of trehalose, glucose and probably of fructose could be demonstrated but no traces of arabinose or saccharose were found in any of these species.

After elimination of the different sugars, the same material was used to determine the concentration of glycogen spectro-photometrically. This quantitative method showed that the glycogen content of the entire tsetse-fly material was very low, on the average 2 mg per 100 g of tissue, while the amount of glycogen found in *Ornithodoros moubata*, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* was always much higher. In the case of the two species of reduviid bugs studied, the intestine seems to accumulate glycogen: the amount found in isolated guts was very much higher than that found in entire animals. Whole insects on the other hand show a higher glycogen content than specimens without gut.