



Bijdrage tot de kennis van het werkzame bestanddeel der Ricine

<https://hdl.handle.net/1874/253982>



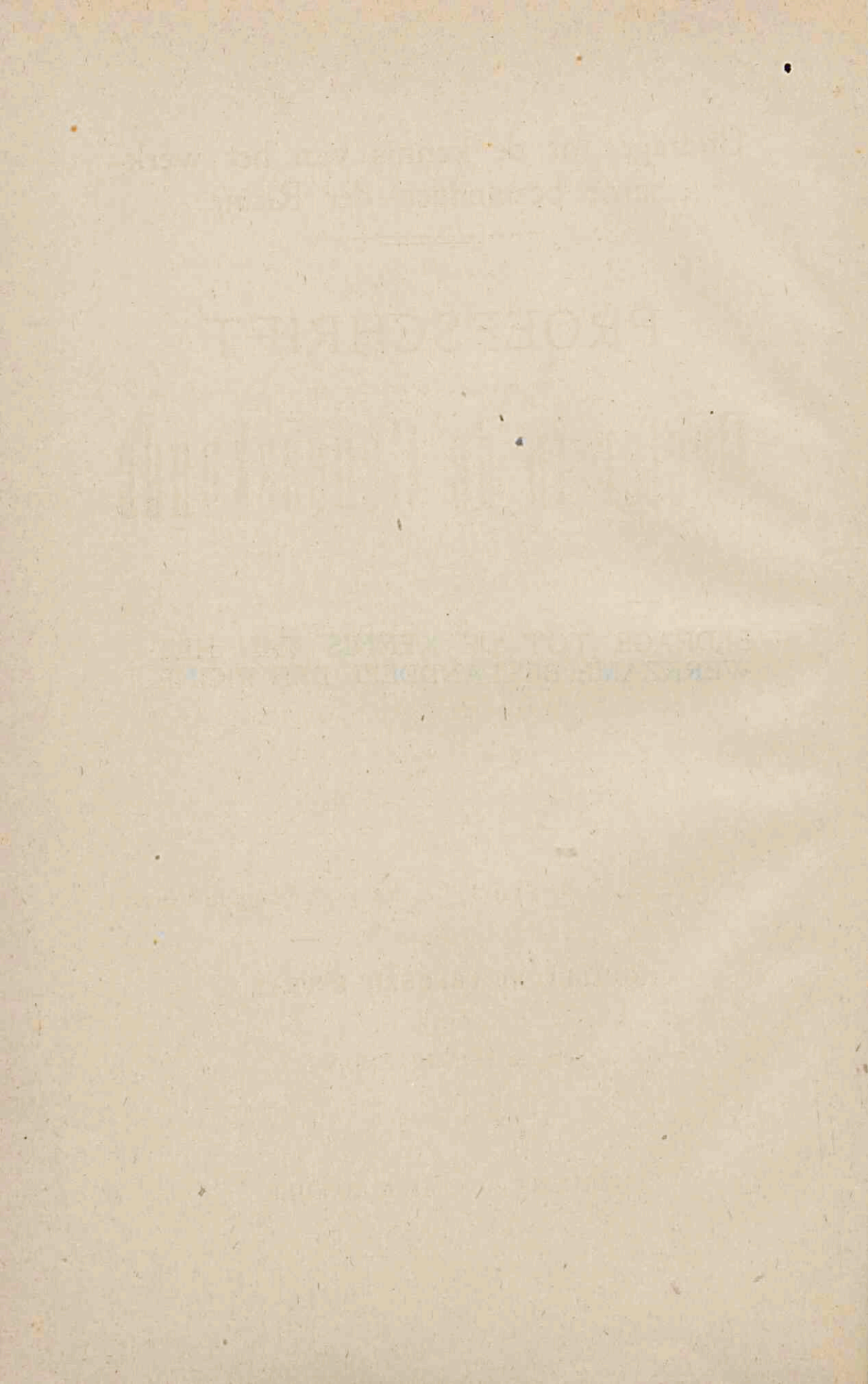
Bijdrage tot de kennis
van het werkzame bestanddeel
der Ricine.

G. F. ROCHAT.

A. qu.
192

Diss. Utrecht 1902 roc

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN HET
WERKZAME BESTANDDEEL DER RICINE



Bijdrage tot de kennis van het werk-
zame bestanddeel der Ricine

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van den graad van

Doctor in de Geneeskunde

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT

na machtiging van den Rector Magnificus

Dr. A. A. W. HUBRECHT

Hoogleeraar in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT

tegen de bedenkingen van

DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

te verdedigen

op Woensdag 28 Mei 1902 des namiddags te 4 uren

DOOR

GUILLAUME FRÉDÉRIC ROCHAT

ARTS

geboren te AMSTERDAM

UTRECHT — C. H. E. BREIJER



UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3595 9752

Uitgave van de Koninklijke Akademie van Wetenschappen
te Amsterdam

PROEFSCHRIFT

Over de Geschiedenis

van de

Wetenschap

in de

Wetenschap

in de

Wetenschap

Wetenschap 18 Mei 1891

Wetenschap 18 Mei 1891

Wetenschap 18 Mei 1891

Wetenschap 18 Mei 1891



Aan mijne Moeder.

Tot groote dankbaarheid voel ik mij gestemd jegens U Hooggeleerde PEKELHARING voor den steun, dien ik bij de vervaardiging van mijn proefschrift in zoo ruime mate van U mocht ondervinden. Wil mij ook op mijn verdere loopbaan dien steun niet onthouden, evenmin als Uw strenge critiek, waarvan ik het voordeel bij het verrichten van dit onderzoek zoozeer heb leeren waardeeren.

Hooggeleerde SNELLEN SENIOR, dat het mij vergund is gedurende twee jaren als Uw assistent tot U in persoonlijke betrekking te staan, zal ik steeds als een gelukkig voorrecht beschouwen. Mijn bijzonderen dank zij U gebracht voor het vele dat ik van U geleerd heb, en daarnaast voor Uwe liberaliteit die het mij mogelijk maakte tijdens de vervulling mijner betrekking dit proefschrift te voltooien.

Voor hetgeen Gij Hooggeleerde SNELLEN JUNIOR bijgedragen hebt tot mijn klinische vorming blijf ik U steeds verplicht.

Aan U Hoogleeraren en Lectoren der Medische en Philosophische Faculteiten betuig ik mijn dank voor het onderwijs van U genoten.

I.

INLEIDING.

Onder de plantaardige vergiften nemen die, welke voorkomen in de zaden van *Ricinus*, *Abrus precatorius*, en *Croton* een eigenaardige plaats in, daar zij in menig opzicht in hun werking naderen tot stoffen van geheel andere herkomst, de toxinen der bacteriën.

Deze laatste onderscheiden zich door de enorme intensiteit hunner werking, waarin zij de in het dagelijksch leven als zware vergiften bekende stoffen vele malen overtreffen.

Het ricinevergift, waarover in deze bladzijden gehandeld zal worden, is eveneens in buitengewoon kleine dosis werkzaam. Zoo kon *Stillmark* ¹⁾ een hond dooden door intraveneuse inspuiting van 0,03 mG. van zijn preparaat per KG. Hiervan maakte het eigenlijke vergift hoogstwaarschijnlijk nog slechts een deel uit.

Voor aconitine bedraagt de doodelijke dosis 0,1 à 0,2 mG. per KG. konijn.

Evenals tegen toxinen kan men dieren tegen ricinusvergift immuun maken, hetgeen door *Ehrlich* ²⁾ aangetoond is.

¹⁾ Arbeiten des Pharmak. Inst. zu Dorpat 1889, pag. 138.

²⁾ Deutsche Med. Wochenschrift 1891, pag. 976.

Door te beginnen met een zeer kleine, niet letale dosis te geven, en deze bij volgende applicaties langzaam stijgend te vergrooten, kon hij witte muizen zoodanig ongevoelig maken, dat zij 1000 maal de zeker dodelijke dosis ricinevergift zonder reactie verdroegen.

Deze onvatbaarheid is niet slechts een gewinnen aan het vergift, zooals men ook bij andere stoffen kan verkrijgen b.v. bij arsenicum en digitalis, maar volkomen gelijk aan de immuniteit tegen bacterietoxinen. Het serum van geïmmuniseerde dieren is nl. in staat in vitro groote hoeveelheden ricinevergift te neutraliseeren; eveneens verleent het, bij andere dieren ingespoten, dezen een beschutting hiertegen.

Dat deze immunisering mogelijk is, doet vermoeden, dat men bij de studie van het ricinusvergift waarnemingen zal doen, die van nut zijn voor de kennis der toxinen in 't algemeen.

Bij de groote belangrijkheid van deze stoffen voor pathologie en therapie, is het opmerkelijk, hoe weinig omtrent haar samenstelling en eigenschappen bekend is, en hoe weinig zeker deze kennis is. Om verschillende redenen onttrekken zij zich aan een beslissend onderzoek. De voornaamste is wel, dat zij niet dan ten koste van veel arbeid en materiaal in eenigszins te hanteeren hoeveelheden te verkrijgen zijn, waardoor bij het experimenteren een zuinigheid moet worden in acht genomen, die in hooge mate belemmert. En dan nog worden zij gewonnen uit eiwithoudende grondstoffen, en het onzuivere product, waarvan men bij de bereiding uitgaat, is een eiwitprecipitaat. Eiwit is dus ook het eerste lid in de reeks der onzuiverheden, die men weg moet werken, en bij de gebrekkige kennis omtrent eigenschappen en onderlinge scheiding der eiwitstoffen is men alles behalve gewaarborgd

dit volkomen te bereiken en weet men nooit zeker, of niet de verkregen stof bestaat uit veel onwerkzame bijmengselen met slechts een weinig vergift.

Bij de ricine valt tenminste het eerste bezwaar weg. Ricinuszaden zijn in elke hoeveelheid te verkrijgen en het uitgangsproduct is betrekkelijk gemakkelijk te bereiden. Daar nu zoo groote overeenkomst in werking heerscht tusschen dit vergift en de bacterietoxinen, is het niet te verwonderen, dat men het vergiftig bestanddeel der ricinuszaden tot voorwerp van een aantal onderzoekingen gemaakt heeft, waarvan de uitkomsten in de volgende bladzijden in 't kort vermeld zullen worden.

II.

HISTORISCH OVERZICHT.

Het ricinusvergift onderscheidt zich door twee verschillende werkingen. Ten eerste door zijn doodelijke werking op dieren, ten tweede door het doen aaneenklevan der roode bloedlichaampjes. De eerste werking is reeds lang bekend. In het uitgebreide historisch overzicht van *Stillmark* ¹⁾ vindt men alles bijeen, wat men hieromtrent, van oudheid en middeleeuwen af, wist.

Omtrent de werking op dieren schijnt men te moeten aannemen, dat dit vergift doodelijk werkt door verlamming van de ademhalings- en vaatcentra, die, na een latente periode van wisselenden duur, bij kleine dosis van 0,5 mG. ricine van Merck per KG. variërend van 24—36 uur, (*Müller*) ²⁾ intreedt. Gedurende deze latente periode is het dier uiterlijk normaal, slechts bestaat dikwijls diarrhoea, en 't lichaamsgewicht neemt reeds in de eerste 12 uur af, als gevolg van een verhoogde ontleding van eiwit, die blijkt uit de sterke, drie- of viermaal verhoogde N-afscheiding door de urine.

Bij de opening van het cadaver vindt men constant hevige veranderingen in den darmtractus. De mucosa

¹⁾ Arb. des Pharmak. Inst. zu Dorpat. 1889.

²⁾ Archiv. f. Exper. Path u. Pharmak. 42, pag. 305.

is op vele plaatsen hyperaemisch, met hier en daar haemorrhagiën; er is sterke zwelling en hyperaemie van de lymphoïde apparaten van darm en mesenterium.

Op de plaats van inspuiting vindt men, wanneer de dood niet zeer snel gevolgd is, steeds een haemorrhagisch infiltraat.

Mikroskopisch vindt men in bijna alle organen nekrose en degeneratie der cellen. Uitvoerige histologische beschrijving is te vinden bij *Gonçalves Cruz*.¹⁾ Alle latere onderzoekers ontkennen de meening van *Stillmark* en *Kobert*, dat de werking op bloedlichaampjes, die in vitro plaats vindt, iets te maken zou hebben met de vergiftigingsverschijnselen. Nooit vindt men, zelfs mikroskopisch, thrombosen of aaneengekleefde lichaampjes in de organen. Het bloed uit groote vaten is steeds normaal.

De agglutineerende werking op bloed is gevonden door *Stillmark*. Zij is nog bij zeer sterke verdunning waarneembaar. Zoo geeft *Stillmark* ²⁾ aan, dat hij de aaneenkleaving nog duidelijk verkreeg, door bij een suspensie van 1 cc. bloed in 18 cc. physiologische Na-Cl. oplossing, 1 cc. ricine-oplossing, bevattende $\frac{1}{3}$ mg. ricine, te voegen. Na $\frac{1}{2}$ uur kon door filtratie het serum vrij van lichaampjes gemaakt worden. De concentratie van de ricine in de oplossing was 1 : 60.000.

Verschillende bloedsoorten agglutineeren niet even goed, zoo kon bij kattenbloed reeds bij een verdunning van 1 : 20.000 geen volkomen agglutinatatie meer bewerkt worden.

Het verschijnsel der aaneenkleaving hangt niet af van de vloeibare bestanddeelen van het bloed, want

¹⁾ Annales d'Hygiène publique, 1898, pag. 344.

²⁾ Arb. des Pharmak. Inst. zu Dorpat, 1889, pag. 90.

door centrifugeeren met 0,9 % NaCl-oplossing volkomen van plasmabestanddeelen bevrijde lichaampjes agglutineeren evengoed door ricine.

Op een oplossing van haemoglobine werkt de ricine niet. De stof, die de agglutinatatie teweegbrengt, moet zich dus in de stromata bevinden.

Veel is er gestreden over de vraag, of deze twee aparte werkingen aan één en dezelfde stof toekwamen, of wel elk haar eigen chemisch substraat hadden.

Voor *Stillmark* en *Kobert*, die de giftwerking verklaarden uit volproppen van alle kleine vaten met aaneengekleefde lichaampjes en de daaruit voortvloeiende circulatiestoornissen, was er geen reden, twee verschillende stoffen voor deze ééne werking te vermoeden.

Zoodra echter de totale afwezigheid van veranderingen in het bloed van vergiftigde dieren, die deze verklaring zouden kunnen steunen, gebleken was, rees het vermoeden, dat de toxine iets anders zou zijn als de agglutinine.

Cushny ¹⁾ meent de heterogeniteit te mogen aannemen op grond van de onwerkzaamheid van de ricine op het bloed van geïmmuniseerde dieren.

Zoo was het bloed van een proefdier, dat zonder reactie 5000 X de letale dosis verdroeg, geenszins beschut tegen de agglutineerende werking, zelfs scheen deze iets sterker plaats te vinden.

Hetzelfde was reeds te voren door *Erhlich* gevonden. Deze kon aan een oplossing van ricine door toevoeging van één en dezelfde hoeveelheid immuun-serum alle agglutineerende en giftige werking ontnemen, echter werden de bloedlichaampjes van een immuun dier wél aaneengekleefd door ricine.

¹⁾ Archiv f. Exper. Path. u. Pharmak. 1898, pag. 439.

Müller ¹⁾ herhaalde deze proef. Hij maakte een konijn van 2 K.G. zóó immuun, dat het 7.6 m.G. ricine van Merck subcutaan verdroeg; 20 cc. serum van dit dier neutraliseerden 1 cc. 2 0/0 ricine-oplossing volkomen, zoowel wat toxische als agglutineerende werking aangaat.

Het bloed van dit dier, 18 maal met physiologische NaCl-oplossing verdund, vertoonde na toevoegen van ricine sterke agglutinatie; de bloedlichaampjes waren dus niet geïmmuniseerd tegen het gift.

Jacoby ²⁾ vond eveneens, dat bloed van immune dieren geagglutineerd wordt, en wel, dat de van het serum bevrijde lichaampjes normaal gevoelig zijn voor het vergift.

Uit deze waarnemingen blijkt dus, dat de anti-agglutinine zich slechts in het serum bevindt, de lichaampjes zelf niet immuun worden d. w. z. niet de eigenschap verliezen, de ricine-agglutinine te binden.

Dat de agglutinine werkelijk zich aan de lichaampjes vasthecht, werd bewezen door *Müller*, die het filtraat van geagglutineerd bloed volkomen onwerkzaam vond op andere bloedlichaampjes. De vergiftigheid voor dieren was tevens zeer verzwakt, soms opgeheven. Hij en *Jacoby* meenden uit dit resultaat te mogen afleiden, dat de werking op bloed te scheiden was van de vergiftigheid.

Men moet hierbij in 't oog houden, dat in een 15 × verdund bloedmengsel een vrij aanzienlijke mate van agglutinatie aan 't oog ontsnappen kan, zoodat het toch wel mogelijk is, dat er parallelismus tusschen

¹⁾ Archiv f. Exper. Path. u. Pharmak. 1899, pag. 320.

²⁾ Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, 1901. pag. 63.

de vermindering in toxiciteit en agglutinatie-vermogen bestaat.

Bovendien gelukte het *Müller* slechts in verdunde ricineoplossing door toevoeging van bloed alle agglutinine te binden. Bij een 1 % ricineoplossing kon hij door overmaat van onverdund bloed niet bewerken, dat het filtraat van de samengeklompte bolletjes niet meer de agglutineerende eigenschap bezat.

Dergelijke proeven zijn genomen door *Rehns*,¹⁾ echter met afwijkende uitkomst. Wanneer deze bij een oplossing van ricine van Merck verdund (5 %) konijnenbloed in overmaat voegde, en de vloeistof liet bezinken, vond hij, dat alle ricine door de lichaampjes vastgelegd was. Immers de bovenstaande vloeistof was volmaakt onschadelijk voor dieren, en vertoonde niet de geringste agglutineerende werking meer. De ricine was geheel overgegaan op de samengekleefde lichaampjes, want werden deze, na eenige malen gewasschen te zijn met 0,9 % NaCl, in suspensie gebracht, dan veroorzaakte een kleine hoeveelheid van deze suspensie den dood van de proefdieren, bij welke zij werd ingespoten.

Dat deze onderzoeker zoowel alle vergift als alle agglutinine uit de vloeistof zag verdwijnen, terwijl *Müller* van beiden nog sporen overhield, wijst er op, dat deze laatste te weinig bloed toevoegde aan de ricineoplossing.

Indien men de geagglutineerde lichaampjes affiltreert, en dan het filtraat niet vergiftig vindt, behoeft dit niet te berusten op een chemische binding van het gift aan de lichaampjes, zooals *Jacoby* terecht opmerkt. Het kan er eenvoudig door meegesleept zijn,

¹⁾ Comptes rendus de la Soc. de Biologie, 1902, No. 3, pag. 89.

zooals bij de meest verschillende neerslagen gebeurt.

Daarom gebruikte hij bloed, dat door citroenzure natron verhinderd was te stollen, voegde hierbij een hoeveelheid ricine, die niet voldoende was om totale agglutinatie te veroorzaken, zoodat er zeker geen ricine in overmaat was, en injecteerde het mengsel bij konijnen. Hij vond nu dat de giftigheid quantitatief dezelfde was gebleven.

Men zou hieruit kunnen afleiden, dat de beide werkingen totaal onafhankelijk van elkaar waren, immers de agglutinine is geheel aan de lichaampjes gebonden, het vergift toch nog werkzaam. *Jacoby* zelf merkt echter op, dat deze conclusie niet noodzakelijk is, immers de bloedlichaampjes kunnen zeer goed het gebonden vergift in corpore weer afstaan.

Door deze wijze van experimenteeren komt het vraagstuk omtrent de identiteit der beide werkingen niet veel verder. Meer licht schijnt het resultaat, dat *Müller* ¹⁾ door digestie met maagsap bereikte, te zullen geven.

Wanneer hij ricine gedurende 12, 16 of 24 uur met 0,2 % — 0,4 % HCl en pepsine digereerde, de vloeistof daarna alkalisch maakte, en een hoeveelheid overeenkomend met 1 × de letale dosis inspoot, vond hij de giftwerking onveranderd, daarentegen was de agglutineerende werking geheel verdwenen.

Een contrôle, evenzoo behandeld met te voren gekookt HCl-pepsine, gaf de werking op bloed onverzwakt te zien.

Hierbij dient opgemerkt te worden, dat *Müller* opgeeft dat de onderste grens van agglutineerende

¹⁾ Archiv. f. Exper. Path. u. Pharmak. 1899, pag 314.

werking bij 20 maal verdund konijnen-bloed bedraagt 0,01 % ricine = 1 op 10.000. De grens ligt echter bij *Stillmark* ¹⁾ veel lager nl. bij 1 op 60.000 en men kan deze nog veel lager vinden, als men het bloed meer verdunt, en de werking onder het mikroskoop nagaat.

Wanneer volgens *Müller* de vloeistof geen agglutinatatie meer te zien geeft, kan zij dus deze werking nog wel in vrij aanzienlijke mate bezitten.

Aan den anderen kant blijkt niet uit zijn stuk, welke de letale dosis vóór de digestie was, zoodat het moeilijk na te gaan is of inderdaad bij digestie de doodelijke werking geheel onverzwakt bleef.

Er blijft dus na dit experiment nog twijfel bestaan, of *Müller's* uitspraak, dat de ricine niet slechts één vergift is, wel voldoende grond heeft.

Bovendien kreeg *Jacoby* bij digestie met HCl-pepsine een afwijkende uitkomst. Wel vond hij een constant blijven van de vergiftige werking, maar altijd vertoonde de gedigereerde ricine nog eenig agglutinatatievermogen. Hij onderzocht dit niet, evenals *Müller*, direct met alkalisch gemaakte digestievloeistof, maar sloeg de ricine na neutralisatie uit het digeraat neer door $\frac{6}{10}$ verzadiging met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en loste deze daarna tot het oorspronkelijk volume op.

Van deze oplossing moest, indien beide werkingen onverzwakt waren gebleven, 0,07 cc. juist nog waarneembaar agglutineeren, 0,13 cc. p. K.G. konijn juist nog doodelijk werken.

Dit nu was niet het geval; de doodelijke dosis

¹⁾ Bij gebruik van een ricine, door neerslaan uit het extract met MgSO_4 verkregen.

kwam experimenteel goed overeen met de berekende waarde, was nl. 0,17 cc. Echter waren er 5 cc. noodig om een merkbare agglutinatie te veroorzaken. De agglutinine was dus zeer verzwakt.

Nu bleek een merkwaardig verschil te bestaan tusschen de gedigereerde en de oorspronkelijke ricine, wat betreft de verhouding tegenover immuunserum.

Bij de gewone ricine is er evenveel van dit serum noodig om de toxische, als om de agglutineerende werking op te heffen.

Bij de gedigereerde ricine, die slechts zeer weinig agglutinine bevat, daarentegen even sterk toxisch werkt, worden deze quantitatief zoo verschillend sterke werkingen door dezelfde hoeveelheid immuun-serum opgeheven.

Om dit verschijnsel te verklaren in den geest van *Ehrlich's* theorie der immunisatie, geeft *Jacoby* een schema van de wijze, waarop de ricine zou kunnen samengesteld zijn. Men zou zich deze stof kunnen denken als een mengsel van toxine met toxoiden. De moleculen toxine zouden dan 3 zijketens hebben: 1e een toxophore, 2e een agglutinophore, 3e een haptophore; de toxoiden zouden de toxophore groep missen.

Door de digestie met maagsap zouden dan de toxoiden verdwijnen. Dan blijft na de digestie de toxische werking dezelfde, de agglutineerende is afgenomen, terwijl dezelfde hoeveelheid immuun-serum beide kan opheffen.

Natuurlijk heeft deze beschouwing slechts de bedoeling, te laten zien, op welke wijze de feiten te verklaren zouden zijn en mist zij vooralsnog den vasten grond om haar tot theorie te verheffen.

*
* *
*

Over den chemischen aard van het vergift loopen de oudere meeningen zeer uiteen. Uit het historisch overzicht, dat *Stillmark* ¹⁾ van deze geeft, blijkt, dat men de vergiftige werking nu eens aan een amygdaline-achtige stof, dan eens aan een andere glycoside toeschreef.

Zelfs meende *Péchohier* ²⁾, getroffen door de uiterst kleine minimale letale dosis, de onderstelling te mogen wagen, dat het vergift niet in de zaden gepreformeerd was, maar eerst in het lichaam gevormd werd, onder invloed van een ferment in de zaden bevat. Het recht van bestaan van deze onderstelling is door *Cushny* ³⁾ nader onderzocht.

Om na te gaan, of in 't lichaam het vergift zich vermeerderde, onttrok hij bloed aan een konijn, twee dagen nadat dit intraveneus een vergiftige dosis ontvangen had. Dit bloed werd gedefibrineerd en bij een kleiner konijn getransfundeerd. Dit bleef evenwel gezond. Ook met het bloed van konijnen, die door inspuiting van ricine gedood waren, kon hij geen intoxicatie bij andere konijnen teweeg brengen.

Bij met ricine gedooide kikvorschen vindt men in de maag een haemorrhagisch exsudaat. Dit veroorzaakt bij een anderen kikvorsch ingespoten, den dood, terwijl zijn maaginhoud weer vergiftig is. Hier heeft

¹⁾ Arbeiten des Pharmak. Institutes zu Dorpat, 1889, pag. 59.

²⁾ Geciteerd naar Stillmark, ibid. pag. 69.

³⁾ Archiv f. Exper Path. u. Pharmak. 1898, pag. 442.

men vermoedelijk niet te doen met een vergiftproductie in 't lichaam, want waarschijnlijk wordt de ricine evenals zoovele andere stoffen door den darm uitgescheiden. In overeenstemming hiermede vindt men altijd in dit orgaan de hevigste verschijnselen.

Ook door het digereeren van ricine-oplossingen van bekende giftigheid met verschillende eitwitoplossingen, kon *Cushny* nooit een toeneming der giftwerking verkrijgen. Een fermentatief ontstaan is dus niet waarschijnlijk te achten.

Door *Stillmark*¹⁾ werd voor 't eerst het verband tusschen de vergiftige werking en de eiwitstoffen der zaden ter sprake gebracht. Hij vond namelijk dat het vergift uit de vetvrij gemaakte zaden kan geëxtraheerd worden door verdunde zoutoplossingen, verdunde zuren of alkaliën, evenzeer door waterhoudende glycerine.

Alcohol, aether, zwavelkoolstof nemen geen spoor er van tot zich.

Uit het extract wordt door dialyse geen of slechts uiterst weinig vergift verwijderd. Daaruit blijkt, dat het een colloïde stof moet zijn.

Het extract geeft alle gewone kleur- en precipitatie-reacties der eiwitstoffen. Door verzadiging met $(\text{N H}_4)_2 \text{S O}_4$ wordt alle eiwit, tevens alle vergift geprecipiteerd, evenzoo door verzadiging met Mg S O_4 en $\text{Na}_2 \text{S O}_4$.

Door Mg S O_4 alleen kon *Stillmark* slechts gedeeltelijk het vergift en het eiwit precipiteeren.

Door koken coaguleert alle eiwit, de oplossing heeft daarna geen vergiftige eigenschappen meer.

Al deze eigenschappen leidden hem er toe, het vergift te beschouwen als een eiwitstof, hoewel hij zich de mogelijkheid niet ontveinsde, dat van de door hem bereide stof het vergift slechts een deel

¹⁾ Arbeiten des Pharmak. Inst. zu Dorpat, 1889, pag. 59.

uitmaakte, dat met de begeleidende eiwitstoffen zoo vast aankleefde dat het aan alle pogingen tot scheiding weerstand bood.

Wel kon hij met zekerheid de oudere meening weerleggen, dat amygdaline of een andere glucoside het werkzame bestanddeel zoude zijn. Want door emulsine werd uit de ricine geen blauwzuur afgesplitst, evenmin leverde zij door koken met verdunde minerale zuren suiker.

*Cushny*¹⁾ op de resultaten van *Stillmark* voortbouwend, trachtte de vergiftige eigenschappen te scheiden van eiwitstoffen.

In de eerste plaats beproefde hij, zooals reeds *Dixon* vóór hem, wat gefractioneerde precipitatie met alcohol in dit opzicht vermocht.

Het bleek hem, dat de verkregen fracties alle giftig waren, maar evenzeer eiwit bevatten.

Door herhaald neerslaan met alcohol nam de oplosbaarheid in water en zoutoplossingen spoedig sterk af, zoodat de oplossingen, die hij beproefde, steeds zwakker concentratie kregen. Op het laatst was die concentratie zoo gering, dat met de gebruikelijke eiwitreagentia geen eiwit meer aan te toonen was, hoewel de vloeistof nog duidelijk vergiftige werking vertoonde. Terecht merkt *Cushny* op, dat men daarom nog absoluut niet mag zeggen, dat het vergift geen eiwitstof is. Want indien hij een dergelijke vloeistof langzaam concentreerde, kon hij er altijd ten laatste eiwit in aantoonen. En indien men van de eiwithoudende ricine een oplossing maakt ter sterkte van 1 op 50.000 dan veroorzaken 2 cc. van deze vloeistof den dood van een konijn, terwijl de eiwitreacties negatief uitvallen.

¹⁾ Archiv für Exp. Path. u. Pharm. 1898, pag. 442.

Pas indien men er in slaagt, een, wat zijn vergiftigheid betreft, sterk geconcentreerde oplossing te verkrijgen, die geen eiwit in aantoonbare hoeveelheid bevat, mag men ontkennen, dat de werking van een eiwitstof afhankelijk is.

Zoodra *Cushny* door de een of andere methode al het eiwit uit een oplossing verwijderd had, was tevens alle vergiftigheid verdwenen. Zoo trachtte hij nog een scheiding teweeg te brengen door toevoeging van een zwaarmetaal-zout en alkali, in de hoop, op die wijze een precipitaat te krijgen van een metaalverbinding van het vergift, waarbij dan het alkali het eiwit zou opgelost houden. Alle metaalzouten leverden echter een negatief resultaat. Hij kwam tot het besluit, dat het vergift of zelf een eiwitstof is, of zich met eiwit in een vaste verbinding bevindt, waaruit het met de gebruikelijke methoden niet los te maken is.

Ook over den aard van dit eiwit doet *Cushny* eenige mededeelingen. Daar hij in tegenstelling met *Stillmark* het vergift volkomen kon neerslaan door verzadiging met $Mg\ SO_4$ (door de oplossing 24 uur lang hiermede te schudden) behoorde de stof onder de globulinen gerangschikt te worden. De albumose, die na de verzadiging met $MgSO_4$ nog in oplossing bleef, bezat geen giftige eigenschappen.

Een constante coagulatie-temperatuur had de oplossing niet. Bij snel verhitten begon de vloeistof bij 63° troebel te worden, bij 74° vormden zich vlokken. Dit laatste gebeurde bij langzaam verhitten reeds bij 55° indien de temperatuur elke 10 minuten slechts één graad steeg. Omtrent zoutgehalte en reactie vermeldt *Cushny* niets, alleen geeft hij op, dat een weinig zuur gemaakte oplossingen evenmin constante coagulatietermperatuur hadden.

Voor een juiste beoordeeling van zijn proeven

ware de kennis van bovengenoemde factoren, die grooten invloed kunnen hebben, zeer gewenscht.

De coagulatie bij lage temperatuur was blijkbaar zeer onvolledig, want een oplossing die 4×24 uur bij 58° gestaan had bij constant gehouden volume, werd weer troebel, toen zij na filtratie nogmaals 24 uur bij 58° gehouden was. Een volledige coagulatie kon bereikt worden door koken, dikwijls echter ook door verhitten op 80° . Zoodra alle eiwit gecoaguleerd was, had de oplossing al haar giftigheid verloren.

Onstandvastigheid van het coagulatiepunt bij verschillende manieren van bepaling is echter een eigenschap, die niet zoo buitengewoon is. Ook kan men het coagulatiepunt van een eiwitstof belangrijk te laag vinden, als men langdurig verhit op een temperatuur ver onder die, waarbij het bij snel verhitten ligt.

Het is dus wenschelijk, bij bepalingen van het coagulatiepunt behalve het zoutgehalte en de reactie, ook de snelheid van stijging der temperatuur steeds gelijk te nemen.

Dat de coagulatietemperatuur zoo verschillend gevonden is, zou ook kunnen wijzen op een samenstelling uit verschillende eiwitstoffen, in hoeveelheid varieerende met de bereidingswijzen.

Volgens *Cushny* is er echter niet meer dan één eiwit in de oplossing, welke meening hij grondt op deze proef:

Een oplossing van ricine, waarvan $\frac{1}{260}$ cc. per KG. konijn vergiftig was, werd 60 uur bij 54° gehouden en daarna gefiltreerd.

In het filtraat bleek $\frac{1}{6}$ minder organische stof te zijn, dan in de oorspronkelijke vloeistof. De vergiftige dosis was geworden $\frac{1}{200}$ cc. Was al het eiwit even giftig, dan zou dit getal moeten zijn $\frac{6}{5} \times \frac{1}{260} = \frac{1}{215}$ cc,

hetgeen met de gevonden waarde vrij wel overeenstemt.

Het schijnt dus dat de vergiftigheid aan één stof toekomt, zegt *Cushny*. De toevoeging van „het schijnt” is zeker niet overbodig. Want uit de gevonden cijfers kan men eigenlijk weinig afleiden.

Wanneer men in 't oog houdt, dat de vergiftige dosis geen scherp begrensde, onveranderlijke waarde heeft, maar belangrijk voor verschillende individuen kan variëren, dan doet men beter de uitkomst van de proef aldus samen te vatten:

De feiten zijn niet in flagranten strijd met de bewering, dat bij verhitting op 58° de uitscheiding van eiwit en de afneming in vergiftigheid gelijken tred houden.

Bij het precipiteeren met verschillende middelen trof het *Cushny*, hoe gemakkelijk ricine door neerslagen van allerlei aard wordt meegesleept. Vooral met neerslagen van ander eiwit gaat veel van 't vergift mee.

Zoo werd een oplossing van ricine, waarin door een koolzuurstroom geen precipitaat ontstond, na vermenging met bloedserum en daarna doorleiden van koolzuur met het globuline-neerslag mee geprecipiteerd; dit neerslag was namelijk sterk vergiftig.

Ook door anorganische precipitaten, zooals baryum-carbonaat wordt de ricine meegenomen. Deze eigenschap staat natuurlijk zeer aan een zuivering in den weg.

Meende *Cushny* uit zijn experimenten zich de meening te mogen vormen, dat eiwit een bestanddeel van het vergift, of wel het vergift zelf was, daartegenover zijn door *Müller* proeven genomen, die grooten twijfel aan de juistheid van deze opvatting verwekten.

Deze proeven hadden ten doel, de verhouding van pancreassap en maagsap tegenover oplossingen van ricine na te gaan.

Hieromtrent zijn door *Stillmark* slechts weinig gegevens verzameld. Hij beschrijft twee proeven.

Een oplossing, die 27 mG. ricine bevatte, werd met 10 cc. actief pancreas-infuus 28 uur gedigereerd bij 40° en zwak alkalische reactie.

Na injectie van de digestievloeistof bij een konijn, stierf dit in 9 uur zonder eenige verandering te vertoonen bij sectie.

5 mG. van dezelfde ricine met 1 cc. van hetzelfde pancreas-infuus werd evenzoo behandeld en bij een konijn van 2200 Gr. in de vena jugularis ingespoten. Het dier stierf niet, was slechts voorbijgaand onwel.

Op grond van deze twee proeven meende *Stillmark* dat digestie met pancreas de vergiftige werking sterk vermindert, zelfs opheft, hoewel de werking langzaam geschiedt.

Door dit aantasten van het vergift door een digestief agens, meende hij nu te kunnen verklaren, waarom bij toedienen per os de dodelijke dosis 100 X groter is dan intraveneus of subcutaan.

Müller werd genoopt, deze digestieproeven te herhalen, door de waarneming van *Gottlieb*, dat digestie met pancreas-infuus de werking niet ophief. 't Was echter niet nagegaan, of er niet tenminste een verzwakking van de giftigheid na digestie plaats vond. Hiertoe waren quantitatieve proeven noodig.

De beschrijving van een dezer proeven luidt aldus: 1 cc. van een oplossing van Merck's ricine in soda, die per cc. 3 mG. bevatte, doodde 1200 gram konijn in 23 uur.

Na digestie met trypsine werd een hoeveelheid digeraat overeenkomende met 4 mG. ricine in de oorspronkelijke oplossing, dodelijk gevonden voor 1500 gram konijn in 19,5 uur.

Dus vóór en ná digestie was 2,6 mG. per kilo doodelijk.

Uit deze proef concludeert *Müller*: Een oplossing van ricine is na krachtige digestie met trypsine even werkzaam als daarvoor.

Heeft hij tot deze conclusie het recht?

Direct treft ons de zeer groote dosis, die bij dit proefdier aangewend werd: 2,6 mG. ricine van Merck per KG. Vergelijken we deze met de hoeveelheden door anderen gebruikt, dan vinden we bij *Stillmark* dat 0,03 mG. van zijn preparaat per KG. een grooten hond doodde bij intraveneuse injectie. *Jacoby* neemt voor ricine van Merck als kleinste snel doodelijke dosis per KG. konijn 0,5 m.G. aan (subcutaan).

Het schijnt dus wel, alsof *Müller* vele malen de minimale letale dosis heeft ingespoten. Wanneer men nu met b.v. $10 \times$ de dosis letalis minima in een zekeren tijd een dier kan doden, en men onderwerpt die hoeveelheid aan een zekere bewerking, om haar vervolgens in te spuiten bij een konijn, waarbij het blijkt, dat dit dier nog vrijwel even snel te gronde gaat, dan heeft men geenszins het recht te zeggen, dat die bewerking zonder invloed geweest is. Immers 90% van het vergift kan daardoor vernield zijn, zonder dat dit uit het resultaat van de proef blijkt.

Als eerste voorwaarde mag men aan een dergelijke proefneming stellen, dat zij ondernomen worde met de kleinst mogelijke dosis. Slechts dan kan men uitmaken, of er eenige vermindering der giftige werking heeft plaats gehad.

Zelfs indien aan boven genoemd bezwaar tegemoet gekomen wordt, lijkt het moeilijk, zoo niet onmogelijk, met de gebruikte methode een resultaat te bereiken. Want geenszins reageeren alle exemplaren van

dezelfde diersoort gelijk op inspuiting van ricine. Wat dus voor 't een dier een snel doodelijke dosis is, zal bij een ander pas na langer tijd den dood veroorzaken. Ten onrechte zou men dan, dit tweede dier als object gebruikende, tot een mindere vergiftigheid van de injectievloeistof besluiten.

Bovendien is er slechts binnen zéér ruime grenzen evenredigheid tusschen levensduur en hoeveelheid vergift. Dit blijkt voldoende uit de vergelijking van verschillende proeven van *Stillmark*.

Bij groote honden werd intraveneus ricine ingespoten.

PROEF.	mG. per KG.	DOOD NA :
73.	0,2.	22 uur.
74.	0,2.	28 "
75.	0,07.	18 "
76.	0,03.	14 "

Twee katers kregen intraveneuse inspuitingen van hetzelfde preparaat.

PROEF.	mG. per KG.	DOOD NA :
57.	1,7.	15 uur.
58.	0,4.	23 — 28 uur.

Hieruit blijkt, dat, zelfs bij vrij kleine giften, de dosis 7 maal resp. 4 maal kleiner kan worden, zonder invloed te oefenen op de latente periode der vergiftiging.

Ook om deze reden is de conclusie van *Müller*,

getrokken uit het feit, dat een konijn vóór de digestie 23 uur, daarna 19,5 uur leefde na injectie van overeenkomstige doses, zeer gewaagd.

De eenige zekere gevolgtrekking uit op deze wijze verrichte proeven kan deze zijn: dat ricine door digestie met trypsine in 24 uur niet geheel vernield wordt.

Ook met digestie door maagsap deed *Müller* proeven: 5 cc. van een ricine-oplossing werd met 0,2 % HCl-pepsine van gecontrôleerd goede werking 12 uur bij 39° gedigereerd, daarna alkalisch gemaakt en een hoeveelheid, overeenkomende met de letale dosis voor 24 uur, bij een konijn geïnjecteerd.

Het dier stierf na 7 dagen met typische verschijnselen.

Een contrôleproef, met te voren gekookt pepsine-HCl bewerkte den dood „binnen den te verwachten tijd.”

In 2 andere, gelijksoortige proeven bewerkte de inspuiting van gedigereerde ricine-oplossing in éénmaal letale dosis den dood in 30 uur.

Over de grootte van deze éénmaal letale dosis laat *Müller* zich niet uit. Vermoedelijk is zij ook hier wel vele malen te groot geweest voor een scherp antwoord op de vraag, of pepsine-HCl ricine aantast of niet. In allen gevalle geeft de eerst aangehaalde proef alles behalve recht te meenen, dat de digereerende werking niet bestaat, immers de digestie stelt den doodelijken afloop van 24 uur tot 7 dagen uit. Overigens gelden dezelfde bedenkingen tegen de bewijskracht der methode als die, welke bij de digestie met trypsine zijn aangevoerd.

Over de waarneming van *Müller*, dat door digestie met pepsine-HCl de giftwerking gescheiden wordt

van de agglutineerende, is reeds vroeger gehandeld.

De digestieproeven van *Müller* zijn herhaald en uitgebreid door *Jacoby*. ¹⁾

Deze vond, dat men reeds door gefractioneerd neerslaan met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ de ricine van een deel der onzuiverheden kan bevrijden, daar het vergift bijna geheel overgaat in het deel, dat bij $\frac{6}{10}$ verzadiging neerslaat.

De bij $\frac{1}{10}$ en $\frac{8}{10}$ verzadiging verkregen neerslagen bevatten slechts weinig vergift.

Ten einde nu na de digestie het vergift weer in handen te kunnen krijgen, zonder bijmengselen uit de digestievloeistof, gebruikte hij slechts dat deel van een pancreasinfuus, dat bij volkomen saturatie met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ neersloeg, na te voren alles, wat bij $\frac{6}{10}$ saturatie precipiteerde, verwijderd te hebben.

Door na digestie bij $\frac{6}{10}$ verzadiging uit te zouten sloeg hij slechts 't vergift, geen pancreas-bestanddeelen neer.

Hem bleken nu twee dingen:

1e. dat, zelfs na eenige maanden digereeren, de vergiftigheid door pancreasinfuus niet verminderd wordt.

2e. dat het uit de digestievloeistof afgescheiden vergift vrij van eiwitreacties is.

Bij zijn proeven bepaalde *Jacoby* eerst hoeveel van het oorspronkelijk materiaal voor 1 KG. konijn de snel doodelijke dosis was. Na digestie werd bij $\frac{6}{10}$ verzadiging met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ neergeslagen, en het precipitaat, dat „sehr geringfügig” was, in een bekend volume vloeistof opgelost.

Hiervan werd een hoeveelheid ingespoten, die overeenkwam met de oorspronkelijke dosis vergift.

¹⁾ Archiv. f. Exp. Path. u. Pharm. 1901, pag. 36.

Bleek nu dat het dier nog snel te gronde ging, dan noemde hij de werking onverzwakt.

Het komt er ook hier weer zeer op aan te weten, hoe groot de snel dodelijke dosis genomen is. Uit verschillende opgaven blijkt, dat *Jacoby* hiervoor heeft aangenomen 0,5 mG. van de ricine door *Merck* in den handel gebracht, dus een vrij groote dosis, waartegen de vroeger genoemde bezwaren ook weer aan te voeren zijn.

Voorts blijkt uit de protocollen van verschillende proeven, dat *Jacoby* het begrip snel dodelijk laat varieeren tusschen 1 en 7 dagen. Vergelijken we de proeven van *Stillmark* onderling, dan blijkt, dat men om binnen een bepaalden tijd den dood te veroorzaken, zeer verschillende doses kan gebruiken:

De uitkomsten van inspuiting van eenzelfde preparaat bij katten waren als volgt:

mG. per KG.	Levensduur.
1,7.	15 uur.
0,4.	18 "
0,3.	20 "
0,1.	36 "

Bij honden:

mG. per KG.	Levensduur.
0,1	een nacht.
0,2	22 uur.
0,2	28 "
0,07	18 "
0,03	14 "

Deze getallen hebben betrekking op intraveneuse injectie. Ook bij subcutane injectie zijn echter volgens *Müller* „sehr erhebliche Schwankungen” te constateeren.

Dat er dus werkelijk geen aantasten van de giftige werking plaatst vindt, schijnt door deze proeven evenmin bewezen. Het verdient echter opgemerkt te worden, dat de na de digestie neergeslagen ricine, in water opgelost, door vernieuwde toevoeging van pancreasinfuus snel onwerkzaam gemaakt wordt. *Jacoby* meent dit te moeten toeschrijven aan een beschuttende werking van de verontreinigende eiwitstoffen. Het is echter ook zeer goed mogelijk, dat de digestieproducten eenvoudig de trypsine-werking beletten. Wanneer door de gefractioneerde precipitatie deze verwijderd zijn, gaat de digestie weer snel haar gang.

Ook met andere eiwit-vernielende stoffen kon *Jacoby* geen verzwakking van ricine-oplossingen verkrijgen. Digestie met papayotine verschoof echter den letalen termijn van „snel” tot 6 dagen, 't geen in de bewijsvoering van *Jacoby* evenwel niet als verzwakking opgevat wordt.

Met pepsine-HCl kreeg hij 't volgend resultaat:

De berekende snel letale dosis per K.G. konijn was 0,13 cc. Gevonden werd na digestie gedurende 5 dagen:

0,8 cc	doodden in 2 dagen.
0,38 cc	„ „ 1,5 dag.
0,17 cc	„ „ 2 dagen.
0,08 cc	„ „ 5 „

Schijnbaar is er zeer groote overeenkomst tusschen berekende en gevonden waarde (0,13 en 0,17—0,08). Inderdaad kan er echter bij deze getallen nog $\frac{2}{3}$ van

het vergift verdwenen zijn, zonder dat dit blijkt uit de uitkomst.

Want het getal 0,13 beteekent, indien het op dezelfde wijze als de na de digestie verkregen waarde bepaald is, niet, dat 0,13 werkzaam is, 0,12 niet meer, maar drukt slechts uit, dat 0,26 snel doodelijk, 0,13 nog snel doodelijk, 0,065 na eenige dagen doodelijk is.

Dus: vóór digestie:

0,13 cc. snel doodelijk; 0,065 cc. niet.

na digestie:

0,17 cc. snel doodelijk; 0,085 cc. niet.

Nemen we nu als uiterste geval de laagste waarde vóór de digestie, de hoogste daarna, dan vinden we, dat binnen de gegeven grenzen $\frac{0,17}{0,06} =$ bijna 3 malige afneming mogelijk is geweest.

Daarbij komt nog, dat de cijfers om de bovengenoemde redenen op zich zelf reeds niet zeer nauwkeurig kunnen zijn.

In tegenspraak met *Müller* vond hij na digestie met pepsine-HCl de agglutineerende werking niet geheel opgeheven, wel verzwakt.

Door toevoeging van H_2O_2 werd eveneens geen verzwakking verkregen, tenminste in de „onzuivere” ricine. Het door pancreas-digestie en uitzouten gezuiverde preparaat wordt onder gasontwikkeling snel vernield.

Zonder twijfel pleiten deze waarnemingen van *Müller* en *Jacoby* wel tegen de eiwitnatuur van het ricinus-gift. In 't algemeen toch worden door krachtige digestie-vloeistoffen eiwitstoffen ontleed in zeer hoge mate, terwijl uit boven aangehaalde experimenten in

allen gevalle blijkt, dat de werking op ricine geen zeer belangrijke is, zoo ze al bestaat.

Aan den anderen kant moet overwogen worden, dat er in dit opzicht belangrijke quantitatieve verschillen tusschen verschillende eiwitstoffen voorkomen. Men kan zich nu voorstellen, dat ricine een eiwitstof is, die zéér resistent tegen deze agentiën is.

Van veel meer gewicht is de ontdekking van *Jacoby*, dat men aan den eisch voldoen kan, een, wat zijn giftigheid betreft, geconcentreerde oplossing te maken, die geen eiwitreacties geeft.

Dit kan men bereiken, door de met gefractioneerd pancreasinfuus gedigereerde ricine bij $\frac{6}{10}$ verzadiging neer te slaan en het precipitaat in zout op te lossen.

Een dergelijke bereiding wordt aldus beschreven:

1 Gram ricine van Merck wordt herhaaldelijk door neerslaan bij $\frac{6}{10}$ verzadiging (met $(\text{NH}_4)_2 \text{S-O}_4$ en weer oplossen gezuiverd, daarna gedialyseerd en in 50 cc. Na-Cl 100% opgelost; 20 cc. van deze oplossing worden 36 dagen gedigereerd met 100 cc. gefractioneerde trypsine-oplossing bij neutrale reactie, daarna bij $\frac{6}{10}$ verzadiging neergeslagen, gewasschen, opgelost, en nogmaals uitgezouten en gewasschen, daarna, zonder dialyse, opgelost in 20 cc. NaCl 10 %.

1 cc. van de *oorspronkelijke* oplossing bevat 20 mG. ricine, gelijk 40 maal de snel doodelijke dosis.

1 cc. bevat *na digestie* 43 snel doodelijke doses en geeft maximale agglutinatie.

De biureet-reactie, de xanthoproteïne-reactie, de reactie van Adamkiewicz, de reacties met picrinezuur en sublimaat zijn vóór de digestie positief, daarna negatief. De reactie van Millon is vóór en ná digestie anegatief.

De kookproef en tannine geven in beide gevallen een positieve uitkomst, echter na digestie zéér zwak.

Hierbij zouden wij willen opmerken, dat in een oplossing, die ammoniumsulfaat in onbekende hoeveelheid bevat, de biureet-reactie tot vergissingen aanleiding geven kan, indien niet zeer veel natronloog wordt toegevoegd. Bovendien is het niet de gevoeligste eiwitreactie. Het ontbreken der xantho-proteïne-reactie is van meer belang.

Dat de kookproef positief uitviel, bewijst, dat er toch nog wel sporen van eiwit in de oplossing voorkwamen.

Verder is het van veel gewicht te weten hoe de vergiftigheid van 43 doodelijke doses per cc. bepaald is, opdat men kunne nagaan, binnen welke grenzen dit getal door onzekerheid in de bepalingen kan variëren.

Eindelijk is het van belang te weten, wat wel de kleinste dosis is van het door $\frac{6}{10}$ verzadiging met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gereinigde ricine van Merck, die 1 KG. konijn snel dooden kan.

Want de aangenomen dosis voor het ricine van Merck (0,5 mG.), op zich zelf zeker reeds zéér hoog, wordt nog aanmerkelijk meer te groot, wanneer men:

1e. het aschgehalte (25—35%) in aanmerking neemt,

2e bedenkt, dat alles wat door $\frac{1}{10}$ en $\frac{8}{10}$ verzadiging met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ er uit wordt neergeslagen onwerkzaam is, het vergift slechts de fractie $\frac{6}{10}$ uitmaakt.

Dan is het ook waarschijnlijk, dat 40 maal de letale dosis, aldus berekend, per cc. volstrekt niet meer zulk een geconcentreerde oplossing uitmaakt, de eiwitreacties dus al zwak zullen zijn. Bovendien kan het

zeer wel zijn, dat de aldus voorloopig gereinigde ricine een mengsel is, van een zéér sterk werkend eiwit met veel onwerkzame andere eiwitstoffen, die sterker dan dit eerste door trypsine worden aangetast. Het is niet uitgesloten, dat deze zéér sterk werkende stof in de aanwezige verdunning nauwelijks meer eiwitreactiën geeft.

III.

EXPERIMENTEEL GEDEELTE.

Bij alle proeven werd als materiaal gebruikt versche zaden van *Ricinus Communis major* (Palma Christi) geleverd door den zaadhandel van *E. Benary* te Erfurt. Deze zaden werden van de schil ontdaan en goed fijn gewreven. In tegenstelling met die der ricine van *Merck* wordt bij de bereiding alle alcohol en aether zorgvuldig vermeden, om beschadiging van het vergift te voorkomen. Uit de proeven van *Cushny* toch blijkt dat door alcohol het vergift langzamerhand onoplosbaar gemaakt wordt.

Ter verwijdering van de olie, die met de vergiftige werking niets te maken heeft, en ongeveer de helft van het gewicht der zaden uitmaakt, wordt door langdurig wrijven met een oplossing van 1 % NaCl een emulsie bereid. Nadat deze onder herhaald omroeren 24 uur gestaan heeft, daarna eenige uren in rust gelaten is, komt de olie aan de oppervlakte drijven. Het extract kan dan door afhevelen afgezonderd worden. Na filtratie onder druk door een samengeperste prop filtreerpapier verkrijgt men het als een volkomen heldere, vetvrije vloeistof, eenigszins geel gekleurd en van duidelijk zure reactie.

Van deze vloeistof werd nu in de eerste plaats

onderzocht, welke groepen van eiwitstoffen zij bevatte. Hiertoe werd zij gedurende 24 uur tegen stroomend water gedialyseerd. Na dien tijd heeft zich een precipitaat gevormd, er komen dus stoffen in de oplossing voor, die bij onttrekking van zout neerslaan.

Werd nu de troebele vloeistof door verdund azijnzuur zwak zuur gemaakt, dan veranderde de aard van het precipitaat. Terwijl dit eerst fijnkorrelig was met een zeer geringe neiging om te bezinken, werd het nu vlokkig en zette zich vrij snel op den bodem van het glas af.

Door centrifugeeren werd nu deze in azijnzuur onoplosbare stof van de vloeistof gescheiden. Na met water gewasschen te zijn, bleek ze op te lossen in zeer verdunde NaOH oplossing. Daarbij bleek, dat het mogelijk was, de stof volkomen op te lossen bij neutrale reactie, zij bezit dus zure eigenschappen.

Uit de neutrale oplossing kon zij door verdund azijnzuur weer vlokkig afgescheiden worden, terwijl ze in overmaat hiervan moeilijk oplosbaar bleek.

Na verwijdering van bovengenoemde stof uit het extract, bevatte de vloeistof nog vrij veel eiwit. Werd de zure vloeistof met zeer verdund alkali geneutraliseerd, dan kwam er opnieuw een precipitaat, dat bij alkalische reactie weer verdween. Bij toevoegen van alkali bleek, dat de vloeistof niet scherp neutraal te maken was, doch amphoteer ging reageeren. Men kon echter zooveel alkali toevoegen, dat blauw lakmoes-papier niet meer rood werd, zonder dat het neerslag nog oploste.

Na afscheiding door centrifugeeren bleek deze stof op te lossen in verdund alkali, waartoe echter een duidelijk alkalische reactie vereischt werd. Door neutraliseeren werd zij weer vlokkig neergeslagen. Voegt

men een weinig overmaat van zuur toe, dan verdwijnt het precipitaat weer.

Scheen de eerst bereide stof door de wijze, waarop ze wordt neergeslagen, een nucleoproteïde te zijn, de laatste stof had meer overeenkomst met een globuline. Van een nadere classificeering werd voorloopig afgezien, totdat zou zijn uitgemaakt, welke rol deze stoffen spelen bij de werking van de ricine.

De reeds van bovengenoemde twee eiwitstoffen bevrijde vloeistof bevatte nog meer eiwit. Werd zij na neutralisatie met MgSO_4 verzadigd, dan ontstond nog vrij veel precipitaat. Indien deze verzadiging geschiedde bij kamertemperatuur ($15-18^\circ \text{C}$) dan werd niet al het aanwezige eiwit neergeslagen, want hoewel het filtraat bij schudden met een nieuwe hoeveelheid MgSO_4 helder bleef, deed Na_2SO_4 opnieuw een neerslag ontstaan. Het scheen dus, alsof na verwijdering van globulineachtige stoffen er nog albumine in de vloeistof aanwezig was. Het bleek evenwel dat dit niet zoo was. Want het precipitaat door Na_2SO_4 verkregen, en opgelost in weinig water, werd na dialyse weer ten deele neergeslagen. Ook veroorzaakte MgSO_4 in de oplossing opnieuw een precipitaat. Het bleek dus, dat de precipitatie met dit zout bij gewone temperatuur slechts onvolledig plaats vindt.

Werd bij 37° verzadigd en daarna bij dezelfde temperatuur gefiltreerd, dan kon uit het filtraat geen neerslag meer verkregen worden door schudden met Na_2SO_4 kristallen.

Hiermede was de afwezigheid van albumine aangetoond.

Stillmark kon eveneens door verzadigen met MgSO_4 bij gewone temperatuur niet alle eiwit neerslaan. *Cushny* geeft op, dit wel bereikt te hebben, echter

door schudden gedurende 24 uur met het zout. Deze behandeling is echter voldoende om allerlei eiwitstoffen neer te slaan, zelfs te coaguleeren.

Volgens *Ramsden* ¹⁾ kan men door schudden alleen reeds een albumine-oplossing uit kippeneiwit bijna geheel in onoplosbaren toestand brengen. De methode door *Cushny* gevolgd kan dus niet dienen, om de afwezigheid van albumine aan te toonen.

Het bleek nu, dat elk der drie stoffen thans uit het extract bereid, het vermogen bezat roode bloedlichaampjes te doen aaneenkleven.

De in azijnzuur onoplosbare stof gaf, opgelost in NaCl 0,9 % met een weinig verdunde soda tot nog neutrale reactie, snel totale aaneenkleving in een suspensie van 1 cc. gedefibrineerd konijnenbloed in 49 cc. NaCl 0,9 %, zoodat na filtratie geen bloedlichaampjes in 't filtraat overgingen.

Evenzoo de door neutraliseeren verkregen stof na oplossing in 0,9 % NaCl.

De stof, die na verwijdering van de twee andere met $MgSO_4$ neergeslagen was, werd in een dialysator gebracht en een dag gedialyseerd; daarna was ze voor 't grootste deel opgelost. Na filtratie bracht ze evenzeer totale aaneenkleving te weeg in het bloedmengsel.

Dat het bijgemengde $MgSO_4$ geen deel had aan deze agglutinatie, bleek na verwijdering van het eiwit door koken en filtreren, waarna de vloeistof geen werking op bloed meer vertoonde.

Het was nu zeer gewenscht te weten, in hoeverre men de drie fracties als afzonderlijke stoffen mocht beschouwen, vóór men er toe overging te trachten het werkzame bestanddeel te isoleeren.

¹⁾ Archiv. f. Physiologie, 1894, pag. 523.

Daartoe werd van elk nagegaan bij welke temperatuur er stolling in ontstond.

Een oplossing van de in azijnzuur onoplosbare stof werd bereid door precipitatie uit een gedialyseerd extract, daarna oplossen in verdund alkali. Vervolgens werd de stof weer afgescheiden door azijnzuur, en de bewerking nog eens herhaald. Daarna werd ze opgelost in 3 % NaCl.

Van deze oplossing werden 5 cc. op een waterbad ingedampt in een kroesje en dit gedroogd bij 110° tot constant gewicht. Na verbranden bij rood-gloeihitte werd nogmaals het gewicht bepaald.

Het verschil tusschen beide wegingen gaf de hoeveelheid eiwit aan in 5 cc. Deze bedroeg 20.2 mG.

De oplossing werd met 3 % Na Cl zoodanig verdund, dat 1 cc. 2.9 mG. eiwit bevatte.

De bepaling van het coagulatiepunt geschiedde in een reageerbuis, waarin een thermometer geplaatst was. Deze werd gestoken door een schijfje kurk, dat de buis van boven los afsloot om verdamping en daarmee verandering van concentratie tegen te gaan.

De buis was geplaatst in een glazen waterbad, dat op een asbestplaat langzaam verwarmd werd. Er werd steeds getracht de temperatuur elke 5 minuten één graad te doen stijgen. De reactie was neutraal.

Bij 55° vertoonde de vloeistof een geringe opalescentie, die bij 60° in een vlokkig precipitaat overging. Nadat de temperatuur 30 minuten op 60—62° gehouden was, werd gefiltreerd.

De vloeistof bleef nu helder tot 78°, bij welke temperatuur zich opnieuw opalescentie vertoonde, bij 80° overgaande in vlokken.

Het vereischte nu $\frac{3}{4}$ uur verhitten op deze temperatuur, eer de vloeistof na filtratie helder bleef

bij langer verhitten. Daarna bleef ze helder tot 87° . Bij $90-91^{\circ}$ kwam er nogmaals een vlokkig neerslag. Na $\frac{1}{2}$ uur was dit volkomen afgescheiden en bleef de vloeistof bij koken helder.

Een oplossing van de tweede stof werd bereid uit hetzelfde extract door, na verwijdering van de stof, die met azijnzuur neersloeg, de vloeistof neutraal te maken.

Het gevormde neerslag werd gezuiverd door oplossing in zwak alkali en afscheiden door neutralisatie.

Nadat deze bewerking nog eens herhaald was, werd de stof opgelost in 3% NaCl en van 5 cc. het gehalte aan eiwit bepaald. Door verdunnen met 3% NaCl oplossing werd dit gebracht op 2,9 mg. per cc. De reactie was neutraal.

Bij verhitten op de wijze boven beschreven bleek de vloeistof helder te blijven tot ongeveer 78° . Bij 80° ontstond een vlokkig precipitaat.

Nadat zij $\frac{3}{4}$ uur op $80-82^{\circ}$ gehouden was, bleef de vloeistof na filtratie helder bij verder verhitten tot koken toe.

De vloeistof, die, nadat de beide vorige stoffen op bovengemelde wijze verwijderd waren, overbleef, werd bij neutrale reactie verzadigd met ammoniumsulfaat. Het precipitaat werd verzameld en in een perkamentpapier buis 2 dagen gedialyseerd.

Na dien tijd werd bij de vloeistof zooveel NaCl gevoegd, dat het gehalte 3% bedroeg, en van de zoo verkregen oplossing, op gelijke wijze als boven beschreven, de coagulatietemperatuur bepaald.

Het bleek nu, dat bij $60^{\circ}-62^{\circ}$ coagulatie plaats vond.

Na filtratie werd in de vloeistof bij 68° reeds een spoor van opalescentie waargenomen, terwijl bij 80° zich een ruim coagulum afzette. Na $\frac{1}{2}$ uur bleek deze

coagulatie afgeloopen te zijn. De heldere vloeistof leverde bij 92° opnieuw een vlokkig precipitaat.

Deze laatste proef geeft reden om aan te nemen, dat na verwijdering van de twee eerste stoffen, de vloeistof niet nog andere stoffen bevat, maar slechts een opgelost gebleven deel van eerstgenoemde.

Verder blijkt, dat slechts de door neutralisatie verkregen globuline-achtige stof werkelijk als een enkele eiwitstof beschouwd mag worden.

De in azijnzuur onoplosbare is of een mengsel van drie stoffen, of een verbinding, waaruit bij verhitting bij verschillende temperaturen deelen afgescheiden worden.

Het was thans de vraag, welke rol deze stoffen spelen bij de eigenaardige werkingen van de ricine.

In de eerste plaats moest worden nagegaan of de nucleoproteïdeachtige en de globulineachtige stof beide vergiftig en agglutineerend waren, en verder in welke mate ze deze eigenschappen bezaten. Voor een quantitatieve bepaling der vergiftigheid was het noodig, van beide stoffen de kleinste dodelijke dosis te zoeken.

Daar nu het hiertoe vereischte, groote aantal proefdieren niet ten dienste stond, werd voorloopig alleen nagegaan, of beide stoffen bij inspuiting den dood tengevolge hadden.

Dit bleek het geval te zijn. Twee cavia's stierven binnen twee dagen na inspuiting van een ruime hoeveelheid van beide stoffen. Beide cadavers vertoonden de verschijnselen in de literatuur beschreven: haemorrhagische zwelling van de plaques in den darm, haemorrhagiën in 't slijmvlies van maag en darmen op de plaats van injectie.

't Bloed van verschillende groote vaten werd vrij van aaneenkleaving gevonden.

Ook bij mikroskopisch onderzoek van stukjes darm na harding in Müller-Formol werden geen volgepropte capillairen aangetroffen, de bloedlichaampjes lagen geheel vrij van elkaar en waren goed geconserveerd.

Dat beide stoffen het vermogen bezaten, roode bloedlichaampjes te doen aaneenkleven, was reeds gebleken.

Thans werd beproefd, of beide stoffen dit vermogen in dezelfde mate bezaten, door oplossingen van gelijke concentratie te maken en na te gaan, bij welke verdunning de werkzaamheid ophield.

Een oplossing van de in azijnzuur onoplosbare stof werd verkregen, door deze na de eerste precipitatie nog twee maal op te lossen in alkali en met zuur neer te slaan, daarna op te lossen in 0,9% keukenzout-oplossing met een weinig Na_2CO_3 tot nog neutrale reactie.

De oplossing bevatte 8,7 mG. eiwit per cc., bepaald door 20 cc. te verdampen en het verschil in gewicht te zoeken tusschen de droge stof en de asch die na verbranding bij roodgloeihitte overblijft.

De andere stof werd uit dezelfde portie extract door neutraliseeren gewonnen en door oplossen in alkali en neutraliseeren nog tweemaal gezuiverd, daarna opgelost in 0,9 % Na Cl.

De oplossing bevatte 2,2 mG. eiwit per cc., bepaald als boven.

Beide oplossingen werden met 0,9 % Na Cl verdund tot het eiwitgehalte per cc. 1,1 mG. bedroeg. Van beide werden nu verdunningen met 0,9 % NaCl gemaakt en van deze telkens 1 cc. bij 9 cc. bloedmengsel gevoegd. Dit bloedmengsel bestond, ook bij alle verdere proeven, uit 2 cc. gedefibrineerd konijnenbloed met 98 cc. 0,9% NaCl.

Na de toevoeging ziet men bij de sterke concen-

traties reeds spoedig de samengekleefde lichaampjes op den bodem van het reageerbuisje zinken, terwijl de bovenstaande vloeistof geheel helder en kleurloos wordt. Bij de geringe concentraties is het intreden der agglutinatie niet zoo duidelijk. Het is noodig, een proefje te filtreeren en filtraat en filterrest te vergelijken met die van een contrôlebuisje, bevattende 1 cc. 0,9 % NaCl en 9 cc. bloedmengsel.

De uitkomsten zijn bijeengevoegd in onderstaande tabel. Korthedshalve wordt daarin de stof, die onoplosbaar is in azijnzuur met A aangeduid, die, welke door neutralisatie verkregen wordt, met B.

De hoeveelheid eiwit, die, in een cc. van elke verdunning, wordt gevoegd bij 9 cc. bloedmengsel, is in de eerste kolom aangegeven.

TABEL I.

GEHALTE PER CC.	STOF A.	STOF B.
0,1 mG.	helder filtraat in 10 minuten.	direct helder.
0,55	helder filtraat in 30 minuten.	"
0,275	na 1 uur filtraat niet volkomen helder.	in 5 minuten helder
0,11	geen werking.	" 10 " "
0,055	"	" 10 " "
0,022	"	" 20 " "
0,011	"	" 30 " niet geheel helder.

De stof B blijkt dus veel sterker agglutineerend te werken dan stof A. Aangezien er, blijkens de coagulatie-temperatuur, reden bestond B voor één stof te houden, terwijl A dit niet was, lag het voor de hand in B de eigenlijke werkzame stof te zien, waaraan ook A haar agglutinatievermogen ontleende en was het belangrijk te zien, hoe beide stoffen zich na verdere zuivering gedroegen. Indien het gelukte, de werkzaamheid van A hierbij belangrijk te doen afnemen of zelfs te doen verdwijnen, terwijl die van B constant bleef, zou het bestaande vermoeden zeer aan kracht winnen.

Op gelijke wijze als boven beschreven, werden weer beide stoffen bereid en door 3-malige precipitatie gezuiverd. Een gedeelte van elk werd nu opgelost in 0,9 % zoutoplossing, een ander deel werd nogmaals neergeslagen en daarna opgelost in zout.

Nadat van alle vier de oplossingen het gehalte bepaald was, werden zij zoodanig verdund, dat van elk 1 cc. 1 mG. eiwit bevatte.

De bepaling van het agglutinatievermogen leverde de volgende uitkomsten.

TABEL II (3 × gezuiverde stoffen).

GEHALTE PER CC.	A.	B.
1 mG.	na 30 min. helder filtr.	direct helder filtr.
0,5	na 30 min. iets helderder dan contrôle.	" " "
0,1	geen werking.	na 5 min. helder filtr.
0,01	"	" 30 " " "

TABEL III (4 × gezuiverde stoffen).

GEHALTE PER CC.	A.	B.
1 mG.	na 30 min. helder filtr.	direct helder filtr.
0,5 mG.	geen verschil met contrôle.	" " "
0,1 mG.	geen verschil met contrôle.	na 5 min. helder filtr.
0,01 mG.	geen verschil met contrôle.	" 30 " " "

Belangrijk verschil is er dus niet te vinden, wanneer men de stoffen nog eens zuivert. Evenmin wordt het verschil groter, wanneer men de zuivering nog verder voortzet.

Hieronder vindt men de resultaten van een proef op gelijke wijze verricht als de vorige, waarbij vergeleken werden de werkingen van beide stoffen na 3 en na 10-malige precipitatie. Deze zuivering moet snel geschieden, omdat de oplossingen anders allicht verschillen zullen vertoonen, voortspruitende uit veranderingen bij het staan ondergaan.

Echter vereischte de bereiding van de 10 maal gezuiverde stoffen ruim twee dagen.

TABEL IV. STOF A.

GEHALTE PER CC.	3 maal neergeslagen.	10 maal neergeslagen.
2,6 mG.	In 10 min. helder filtr.	In 10 min. helder filtr.
1,3 mG.	In 20 min. nagenoeg helder filtr.	In 20 min. nagenoeg helder filtr.
0,26 mG.	In 1 uur niet veel helderder.	In 1 uur nog troebel filtr.

STOF B.

GEHALTE PER CC.	3 maal neergeslagen.	10 maal neergeslagen.
0,04 mG.	In 20 min. geheel helder filtr.	In 20 min. helder filtr.
0,008 mG.	In 1 uur niet geheel helder filtr.	In 1 uur filtraat evenals van de 3 maal neergeslagen stof.

Het blijkt, dat stof A, hoe vaak ook gezuiverd, steeds een groote mate van werkzaamheid behoudt, die niet merkbaar minder is dan vóór de bewerking.

Ook de agglutineerende kracht van stof B blijft dezelfde.

Van de veronderstelling uitgaande, dat B de eigenlijke werkzame stof zou zijn, die in de in azijnzuur onoplosbare stof als bijmengsel zou voorkomen, werd getracht, door precipitatie van deze laatste onder de gunstigste voorwaarden voor scheiding, een stof te bereiden, die onwerkzaam was.

Hiertoe werd de in azijnzuur onoplosbare stof op de gewone wijze bereid en gezuiverd en in verdund alkali opgelost.

Het gehalte van deze oplossing werd bepaald en gevonden te bedragen 5 mG. per cc.

Porties van 5 cc. van de vloeistof werden in eenige reageerbuizen met 15 cc. water gemengd en uit een buret stijgende hoeveelheden 0,5% CH_3COOH toegevoegd, om na te gaan, bij welk zuurgehalte de precipitatie het best plaats vond. Het bleek, dat de voordeeligste hoeveelheid 0,5 cc. bedroeg.

Indien men nu de vloeistof, die een in azijnzuur oplosbare en een daarin onoplosbare stof bevat, uitgiet in azijnzuur, zoodanig, dat dadelijk de gevonden gunstigste concentratie bereikt wordt, heeft men de

meeste kans, de eerstgenoemde stof zuiver neer te slaan, de tweede opgelost te houden.

40 cc van de oplossing werden nu uitgegoten in een vloeistof, bestaande uit 8×15 cc water + $8 \times 0,5$ cc azijnzuur 5%. Daarna werd het neerslag afgecentrifugeerd, gewasschen met water, en opgelost met alkali tot neutrale reactie, tot een volume van 40 cc.

Daarna werd deze oplossing nogmaals uitgegoten in azijnzuur op de boven gemelde wijze, en het precipitaat opgelost, om daarvan de agglutinatiwerking te bepalen. Van 5 cc werd het gehalte aan eiwit bepaald en gevonden 2 mG. per cc.

GEHALTE PER cc	
2 m G.	na 10 min. helder filtr.
1 m G.	" 20 " " "
0,2 m G.	" 1 uur geen werking.

De stof is dus niet onwerkzaam, zelfs niet in eenigszins belangrijke mate in werkzaamheid verminderd.

Door *Halliburton* werd uit organen nucleoproteïde afgescheiden door ze met zout fijn te wrijven en de verkregen brij in veel water uit te gieten. De nucleoproteïde kwam dan als slijmige vlokken boven drijven.

Ook deze methode werd beproefd om de in azijnzuur onoplosbare stof vrij van agglutineerende werking te maken. Om alvast vele bijmengselen te verwijderen, werd een neutraal extract eerst met $MgSO_4$ verzadigd, en het neerslag, na uitpersen tusschen filtreerpapier, met veel NaCl en wat water tot een dunne brij gewreven, vervolgens deze in een groot glas met water uitgegoten. Na een dag staan werd

het bovendrijvend gedeelte voorzichtig afgescheept, opgelost in zwak alkali, en met CH_3COOH neergeslagen. Na herhaling van deze bewerking werd de stof opgelost in 0,9 % NaCl met een weinig soda en van de oplossing het gehalte en het agglutineerend vermogen bepaald.

GEHALTE PER c c	
1,6 m G.	na 30 min helder filtr.
0,3 m G.	" " " filtr. niet geheel helder.
0,16 m G.	" 1 uur filtr. nog = contrôle.

De aldus bereide stof was dus niet van hare werkzaamheid beroofd.

Daar het bleek, dat CaCl_2 in de oplossing van de nucleoproteïdeachtige stof een precipitaat veroorzaakte, werd beproefd, of dit agglutineerende werking had.

De stof, op de gewone wijze gezuiverd, werd in verdunde ammonia opgelost tot neutrale reactie; nu werd druppelsgewijs CaCl_2 oplossing van 10 % toegevoegd, tot zich het neerslag goed afscheidde. In het filtraat gaf verdere toevoeging van CaCl_2 geen neerslag meer, wel werd dit door verdund azijnzuur teweeggebracht.

De mogelijkheid bestond, dat het precipitaat met CaCl_2 juist de niet-werkzame stof bevatte en deze dus op de genoemde wijze uit de vloeistof verwijderd kon worden.

Om dit na te gaan, werd het precipitaat met CaCl_2 ontstaan, in verdunde ammonia opgelost, door azijnzuur nogmaals neergeslagen, en met weinig alkali opgelost tot zeer zwak alkalische reactie.

Van 5 cc. van de oplossing werd het eiwitgehalte bepaald. Dit bedroeg 4,7 mG. per cc.

Vervolgens werd beproefd, of de oplossing agglutinatieteweegbracht.

GEHALTE PER C C	
1,1 mG.	helder filtr. na 10 min.
0,2 mG.	na 1 uur geen merkbare werking.

Het kon ook zijn, dat het gedeelte, dat na de precipitatie met CaCl_2 nog opgelost bleef en met azijnzuur kon worden neergelagen, onwerkzaam was.

Een nieuwe oplossing van de nucleoproteïde-achtige stof werd bereid met behulp van een weinig ammonia en zoolang 10 % CaCl_2 ingedruppeld tot het filtraat bij verdere toevoeging helder bleef. Voegt men overmaat van CaCl_2 toe, dan lost het precipitaat weer op.

Het heldere filtraat werd met azijnzuur zwak zuur gemaakt en het gevormde neerslag door nog eens oplossen en neerslaan gezuiverd, daarna met verdund alkali opgelost.

Het gehalte bedroeg 1,4 mG. per cc.

Deze oplossing vertoonde nu evenzeer agglutineerend vermogen.

GEHALTE PER C C	
1,4 mG.	in 5 min. helder filtr.
0,7 mG.	in 10 min. helder filtr.
0,14 mG.	geen verandering in 30 min.

Na de precipitatie met azijnzuur bevatte de vloeistof nog een weinig eiwit, zooals bleek met de proef van Heynsius.

Na neutralisatie bleek zij ook nog eenig agglutineerend vermogen te hebben, hoewel niet veel.

5 cc. oplossing + 5 cc. bloedmengsel: na 10 min. niet volkomen helder filtraat.

1 cc. oplossing + 5 cc. bloed: na 30 min. geen werking.

De precipitatie met CaCl_2 kan dus niet tot een scheiding van werkzame en onwerkzame stof leiden. Een deel der werkzame stof wordt neergeslagen, een ander deel blijft opgelost.

Door ammoniumsulfaat wordt alle eiwit uit het extract neergeslagen. Of hierna alle werkzame stof uit de oplossing verdwenen is, valt moeilijk te beoordeelen door 't hooge zoutgehalte. Voegt men een weinig van de oplossing bij verdund bloed, dan schrompelen de lichaampjes sterk. Men kan tóch wel waarnemen of er, behalve schrompelling, ook nog agglutinatie plaats heeft gevonden, op de volgende wijze.

Neemt men twee buisjes met gelijke hoeveelheden verdund bloed, en voegt men bij beide gelijke hoeveelheden geconcentreerde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing, bij 't een bovendien een weinig ricine, dan vertoont dit laatste een geheel ander beeld. Terwijl 't buisje zonder ricine een korrelig neerslag bevat, dat zich bij schudden gemakkelijk gelijkelijk over de vloeistof verdeelt, vertoont het buisje met ricine duidelijke klompjes, die zich door schudden niet tot een gelijkmatige suspensie laten verdeelen.

Vergelijkt men nu 't filtraat van het met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verzadigd extract op gelijke wijze met het eerste buisje, dan is er geen verschil te zien.

Door $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ kunnen dus slechts geringe sporen van de werkzame stof achtergelaten worden.

Eenige buisjes met geneutraliseerd extract werden resp. $\frac{1}{10}$, $\frac{2}{10}$, enz. verzadigd met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, door toevoeging van verzadigde oplossing van dit zout.

't Bleek nu, dat reeds bij 0,5 verzadiging bijna alle eiwit neersloeg. Uit het filtraat kon door geheel verzadigen nog een weinig neerslag verkregen worden.

Het precipitaat bij 0,5 verzadiging en dat bij geheele verzadiging van het filtraat verkregen, werden opgelost in water. Beide bleken sterk te werken op verdund bloed.

Doet men de proef met oplossingen van de nucleoproteïde-achtige stof in gezuiverden staat, dan blijkt zij eveneens door 0,5 verzadiging voor 't grootste deel te worden neergeslagen, slechts weinig eiwit blijft in oplossing, en dit kan door geheel verzadigen verkregen worden.

Beide gedeelten vertoonen na oplossing sterke werking op bloedlichaampjes.

Daar hetzelfde gevonden werd bij gefractioneerde precipitatie van de globuline-achtige stof, bestond er geen kans, door ammoniumsulfaat een onwerkzame stof af te scheiden.

Wij hebben gezien, dat de globuline-achtige stof blijkens haar coagulatie-temperatuur, waarschijnlijk als één enkelvoudige stof beschouwd mag worden. Bij deze coagulatie-temperatuur (80°) stolt echter ook een gedeelte van de nucleoproteïde. Het kon nu zeer wel zijn, dat deze laatste stof verontreinigd was met de globuline, of wel zich hiermede in een bij 80° losgemaakte verbinding bevond.

Het was nu de vraag, of na coagulatie van de globulineachtige stof de overblijvende vloeistof geheel haar werkzaamheid verloren had. Indien dit waar

bleek, zou men dus met waarschijnlijkheid deze stof mogen houden voor de draagster der agglutinatiewerking. Nog meer zou dit waarschijnlijk zijn, als ook de nucleoproteïdeachtige stof bij dezelfde temperatuur onwerkzaam werd.

Een oplossing van de globulineachtige stof in NaCl 0,9%, die zeer krachtig bloedlichaampjes deed aaneenkleven, werd bij 80°—82° verhit. Het bleek nu, dat na, $\frac{3}{4}$ uur op deze temperatuur gehouden te zijn, de oplossing geen spoor van aaneenkleving meer teweegbracht in een gelijk volume bloedmengsel.

Werd korter verhit, namelijk $\frac{1}{4}$ uur of $\frac{1}{2}$ uur, dan was er nog een weinig agglutineerend vermogen overgebleven; het bleek nu evenwel, evenals vroeger, dat zoo kort verhitten niet voldoende was, om alle eiwit te coaguleeren. Want werd na filtratie de vloeistof nog eenige minuten op dezelfde temperatuur gehouden, dan kwam er nog een weinig neerslag. Na $\frac{3}{4}$ uur is er evenwel, zelfs bij koken, geen spoor coagulum in 't filtraat te krijgen.

Terwijl van de oorspronkelijke oplossing 1 cc. in 10 cc. bloedmengsel bijna oogenblikkelijk alle lichaampjes samengekleefd op den bodem van 't glas deed zinken, was er nu na de verhitting geen agglutinatiet te zien in een mengsel van 5 cc. oplossing + 5 cc. verdund bloed.

Een neutrale oplossing der nucleoproteïdeachtige stof, waaraan 0,1 cc. in 5 cc. bloedmengsel in 30 minuten volledige agglutinatieteweegbracht, werd 15 min. op 65° gehouden. Na filtratie gaf nog 0,1 cc. in 30 min. volledige agglutinatiet.

Nu werd de vloeistof gedurende 15 min. op 80° gehouden. Hierna was de werking zeer verminderd, 0,1 cc. gaf met 5 cc. bloedmengsel in 30 min. geen

verandering te zien, bij het vermengen van gelijke deelen oplossing en bloedmengsel bleek er nog eenige agglutinatie te bestaan. Maar tevens bleek, dat de vloeistof, bij 80° verder verhit, nog duidelijk opalescent werd. Na nogmaals 15 min. verhitten op 80° — 83° was het filtraat volkomen onwerkzaam, tevens bleef het, gedurende 15 min. verder verhit, volkomen helder.

Een ander deel der oplossing van de nucleoproteïdeachtige stof werd gedurende $\frac{3}{4}$ uur op 75° gehouden. De werking op bloedlichaampjes bleek nu niet veel geringer.

Werd daarna de oplossing gedurende $\frac{3}{4}$ uur op 82° gehouden, dan verloor zij haar werking geheel.

Een neutraal extract van zaden werd bij $\frac{6}{10}$ verzadiging (geheel verzadiging = 76%) ¹⁾ met ammoniumsulfaat neergeslagen, het precipitaat in water opgelost, en gedialyseerd. Nadat door de dialyse het eiwit weer geprecipiteerd was, werd bij den inhoud van den dialysator NaCl gevoegd tot een gehalte van 2% en gefiltreerd. De oplossing bracht in $\frac{1}{2}$ uur nog agglutinatie teweeg bij een verdunning van 20.000 maal. Deze werd bepaald volgens een later te beschrijven methode.

Nadat deze oplossing gedurende $\frac{1}{2}$ uur op 62° gehouden was, werd gefiltreerd en nogmaals de verdunning bepaald, waarbij zij nog werkzaam was. Deze bedroeg weer 1 op 20.000.

Werd het filtraat gedurende $\frac{3}{4}$ uur verhit op 85° dan was er geen agglutinatie te zien in 1 cc. filtraat + 1 cc. bloedmengsel, zelfs niet na 1 uur.

¹⁾ Chemikerkalender 1892.

Het bleek, dat men ook de vergiftigheid voor dieren kan opheffen door bij 80° te coaguleeren.

$^{23}/_{11}$ 5 uur nam. werd bij een cavia 1 cc. globuline-oplossing onder de huid gespoten. Tegelijk krijgt een even zware cavia van denzelfden worp 1 cc. van deze oplossing, die $1/4$ uur op 80° verhit was.

$^{24}/_{10}$ 12 uur v.m. wordt de eerste cavia dood en koud gevonden, het cadaver vertoont de beschreven veranderingen.

$^{25}/_{10}$ 1 uur nam. wordt de tweede cavia dood gevonden met dezelfde veranderingen.

Nu wordt de oplossing gedurende $3/4$ uur op 80° — 82° gehouden, daarna gefiltreerd en 2 cc. bij een cavia onder de huid gespoten.

Dit dier vertoont geen veranderingen gedurende 6×24 uur, en krijgt na afloop van dien tijd 0,75 cc. van de oorspronkelijke oplossing subcutaan. Na 23 — 26 uur volgt de dood, terwijl bij sectie de gewone veranderingen gevonden worden.

Het gelijke verloop van coagulatie bij 80° , afneming in agglutineerende, en afneming in vergiftige werking, draagt er toe bij, dat men zich de meening vormt, dat: 1^e. beide werkingen van de ricine aan dezelfde stof gebonden zijn, 2^e. de stof geen andere is als de door neutraliseeren verkregen eiwitstof, die bij 80° coaguleert. De nucleoproteïde-achtige stof, die ook wel vergiftig en agglutineerend werkt, doch in veel mindere mate dan de globuline, kan deze eigenschappen zeer goed te danken hebben aan een zeker gehalte aan deze laatste stof.

Blijkbaar zijn de beproefde methoden niet voldoende, om dit gehalte merkbaar te verkleinen. Dat dit zoo moeilijk is, pleit wel voor de meening, dat de nucleoproteïde-achtige stof niet is een mengsel, maar een ver-

binding van de globuline met andere eiwitstoffen. Van deze laatste zijn er in de nucleoproteïde blijkens de coagulatieproeven twee aanwezig ; uit de coagulatieproeven blijkt verder, dat zij beide niets te maken hebben met de werking der ricine, daarom werden zij verder buiten beschouwing gelaten. Slechts werd nog aangetoond, dat bij de digestie met maagsap uit de nucleoproteïde-achtige stof een precipitaat verkregen wordt, dat oplosbaar is in alkali en na verbranding volgens de methode van Neumann, phosphorus blijkt te bevatten.

Volkomen tegenspraak heerscht er tusschen de meening, dat het werkzame bestanddeel der ricine een eiwitstof zou zijn, en de conclusies, waartoe *Müller* en *Jacoby* op grond hunner experimenten met maagsap en trypsine kwamen.

Het was daarom noodzakelijk, deze proeven te herhalen met inachtneming van de opmerkingen bij het litteratuur-overzicht gemaakt.

Doch het groote aantal proefdieren, dat vereischt werd bij een herhaling van de proeven over de vergiftige werking, indien men de onzekerheid tengevolge van individueele verschillen in vatbaarheid, door een groot getal proeven zoo klein mogelijk wilde maken, was hier een beletsel. Daarom werd de *vergiftige* werking vóór en ná digestie niet in de eerste plaats nagegaan, maar hoofdzakelijk aandacht geschonken aan de verandering welke de *samenklevende* werking ondergaat.

Daartoe was het echter noodig, nauwkeuriger dan tot nog toe dit agglutineerend vermogen te meten. Voor de beoordeeling van verschillen in deze werking is het niet voldoende, de mate van agglutinatie te

beoordeelen in het reageerbuisje en te schatten op „maximaal,” „gering” enz. Ook de beoordeeling naar de helderheid van het filtraat in een bepaalden tijd is slechts geoorloofd, wanneer het, zooals bij de hierboven beschreven proeven, slechts op de waarneming van aanzienlijke verschillen aankomt.

Daarom werd bij alle volgende proeven een andere methode aangewend. Een aantal glazen schaaltes met deksel werden elk voorzien van 9 cc. physiologische keukenzoutoplossing. In 't eerste schaalte werd nu toegevoegd 1 cc. van de te onderzoeken vloeistof. Na vermenging werd uit dit schaalte, met tienmaal verdunde oplossing, één cm^3 overgebracht in het tweede, dat dus de honderdmalige verdunning bevatte. Op gelijke wijze werden de verdunningen duizend-, tienduizend- en honderdduizend gemaakt.

Nu werden in een aantal platte, met een glasplaat gedekte horlogeglazen telkens 9 druppels van een suspensie van 2 cc. gedefibrineerd konijnenbloed in 98 cc. physiologische zoutoplossing gebracht.

Vervolgens werd met hetzelfde pipetje in elk horlogeglas één druppel van elk der verdunningen van de ricine toegevoegd; daarbij ontstonden dus de verdunningen 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 en 10^6 .

Daarenboven werd nog de verdunning „tienmaal” bereid, door bij 9 druppels van het bloedmengsel één druppel van de onverdunde ricineoplossing te voegen. Als contrôle diende steeds één druppel 0,9 % NaCl met 9 druppels bloedmengsel.

Door de schaaltes en horlogeglazen elk in een rij te plaatsen op een tafel, die in vakken verdeeld was, waarin de verdunning geschreven stond, kon de bewerking vlug en zonder vergissingen plaats vinden.

Wanneer nu na een bepaalden tijd op de hieronder te beschrijven wijze onderzocht was, welke verdunning

nog werkzaam was, wist men dus, tusschen welke termen der reeks 10 , 10^2 , 10^3 , enz. de juist nog werkzame verdunning moest liggen. Was deze b.v. gevonden tusschen 10^4 en 10^5 , dan werden, ter nadere bepaling, de verdunningen $10^4 \times 2$, $10^4 \times 3$ enz. bereid door te vermengen van de verdunning 10^4 :

5 druppels met 5 druppels bloedmengsel.

3	"	"	6	"	"
2	"	"	6	"	"
2	"	"	8	"	"

enz.

Na omroeren werden de horlogeglazen in rust gelaten en na een bepaalden tijd onderzocht. Dit geschiedde door den inhoud om te roeren met een glazen staaf; is er agglutinatie, dan blijkt, dat de lichaampjes op den bodem van het glas een samenhangende membraan vormen, die men bij 't roeren in stukken verdeelt. Is de agglutinatie daarentegen afwezig of gering, dan worden de lichaampjes snel gelijkmatig over de vloeistof verdeeld, die dan geheel gelijk op normaal bloedmengsel, en langzaam bezinkt.

Bij beschouwing onder 't mikroskoop ziet men zeer goed, of de lichaampjes vrij van elkaar zijn, of wel in kleine groepjes samenhangen. In geval van twijfel moet men vergelijken met de omgeroerde contrôle-vloeistof.

Het is onraadzaam, de waarneming later te doen dan 3 of 4 uur na de vermenging, daar dan dikwijls de contrôle eveneens niet geheel vrij blijkt te zijn van aaneengekleefde bolletjes, waardoor de grens niet scherp bepaald kan worden. Bovendien vindt men in een glaasje, waarin na 3 uur nog geen duidelijke samenleving heeft plaats gevonden, deze niet duidelijker al wacht men 12 uur of langer.

De waarneming werd gedaan van $1\frac{1}{2}$ tot 3 uur na

de vermenging. Echter werd deze tijd bij elke afzonderlijke proef steeds vóór en ná de digestie even lang genomen.

Het bleek, dat men nooit in 't onzekere behoeft te verkeerén, tusschen welke termen der reeks 10 , 10^2 , 10^3 enz. de grens ligt. Bij verdere verdunning, om de tusschenliggende waarden te vinden, komt spoedig uit, of in een glaasje van de reeks 10 , 10^2 , 10^3 enz. agglutinatíe aanwezig was of niet.

Bij het beoordeelen van de hiertusschen liggende waarden, bijv. 10 , 20 , 30 , 40 enz., kan men niet altijd nauwkeurig zien, waar de werking ophoudt. De onzekerheid bedraagt echter niet meer dan één of twee termen der reeks.

In 't begin werd, in navolging van *Jacoby*, voor de digestie gebruikt een preparaat, gemaakt door een versch bereid extract eerst voor $\frac{1}{10}$ te verzadigen met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, daarna te filtreeren en 't filtraat voor $\frac{6}{10}$ te verzadigen; 't gevormde neerslag werd eenige malen gewasschen met $\frac{6}{10}$ verzadigd ammoniumsulfaat, daarna in weinig water opgelost en 24 uur gedialyseerd.

De troebele vloeistof werd dan op een gehalte van $0,2\%$ HCl gebracht en gefiltreerd.

Na toevoegen van een weinig pepsine-Witte, werd de boven beschreven vloeistof bij 37° gedigereerd, nadat van een gedeelte, na zwak alkalisch maken, gebleken was, dat de juist nog agglutineerende verdunning van het mengsel 3000 bedroeg.

Na digestie gedurende 2×24 uur werd deze verdunning iets geringer gevonden, nl. 2000.

Na neutralisatie kwam er eenig precipitaat in de

vloeistof; nadat dit door fittreeren verwijderd was, bleek bij koken nog veel coagulabel eiwit aanwezig.

De proef werd nu herhaald met een krachtiger werkend maagsap. Hiertoe werd gebruikt het maagsap van een hond, in 't physiologisch laboratorium te Utrecht aanwezig, die, volgens de methode van Pawlow geopereerd, bij schijnvoeding een zéér krachtig werkend maagsap leverde. De onderstelling, dat het gelukken zou de in de vorige, proef gevonden geringe afneming der werking te vergrooten, werd bevestigd.

De stof, op de beschreven wijze volgens *Jacoby* bereid, en opgelost in 0,2 % HCl, werd met eenige cc. hondenmaagsap gedigereerd bij 37°.

Vóór de digestie bedroeg de juist nog werkzame verdunning, door V aangeduid, na zwak alkalisch maken der vloeistof 70.000.

Na 24 uur was V gedaald tot 2000.

Na 2 × 24 uur tot 100 à 200, terwijl in een hoeveelheid oplossing, die zonder toevoegen van maagsap 2 dagen gedigereerd was, de werking onverzwakt bleek. Na 3 × 24 uur bleek V nog 100 à 200 te bedragen.

Daar de digestie blijkbaar niet verder ging, werd de stof nu ontdaan van digestieproducten, daar vermoed werd, dat deze den voortgang belemmerden. Door $\frac{6}{10}$ verzaadiging van de geneutraliseerde en gefiltreerde vloeistof, werd de stof neergeslagen, daarna gewassen, in weinig water opgelost en na 12 uur dialyse opnieuw aan digestie onderworpen:

Bij de vloeistof werd eenige cc. hondemaagsap gevoegd, en de werkzame verdunning van het mengsel gezocht. Daarna werd bij 37° gedigereerd.

Vóór digestie: $V = 3 \text{ à } 4000$.

Na 2 dagen „ : $V = 2 \text{ à } 3$.

„ 3 „ „ : $V = 0$.

Na wegnemen van de digestieproducten, blijkt de overgebleven agglutinine door nieuw maagsap verteerd te worden. Tevens bleek, dat het eerst rijkelijk aanwezige eiwit verdwenen was, daar de vloeistof na neutralisatie en filtratie geen coagulum meer leverde bij koken.

Indien de giftige stof, zooals *Müller* en *Jacoby* vonden, aan de digestie weerstand bood, moest de vloeistof, die niet meer agglutineerde, ook geen coagulabel eiwit meer bevatte, nog wèl sterk vergiftig zijn. Want door de behandeling, die de vrij sterk geconcentreerde, oorspronkelijke oplossing ondergaan had, kon geen vergift verwijderd zijn. Integendeel, er moest bij het uitzouten na de eerste digestie een concentratie hebben plaats gevonden, blijkens de stijging van V van 100 à 200 op 3 à 4000. Verwacht werd dus een snel sterven der ingespoten dieren.

Een cavia van 500 gram kreeg subcutaan $7/8$ cc. van de digestievloeistof, toen V nog 2 à 3 bedroeg, na alkalisch maken.

Na 2 dagen was de cavia nog in leven, vertoonde slechts een harde zwelling op de plaats van inspuiting. Boven deze zwelling viel in eenige dagen al het haar uit, daarna keerde het dier weer langzamerhand tot den normalen toestand terug en leefde nog na twee maanden.

Een cavia van 500 Gr. kreeg $7/8$ cc. subcutaan van de vloeistof, nadat zij geheel onwerkzaam op bloed was geworden.

Dit dier vertoonde in 't geheel geen verschijnselen, en was na twee maanden nog geheel normaal.

Bij de bespreking der proeven van *Müller* en *Jacoby* is reeds gebleken, dat door hen niet streng bewezen is, dat werkelijk absoluut geen afneming der vergiftige werking bij digestie met maagsap plaats vond. Het kan zeer wel zijn, dat er een zekere mate van werking bestond, en dat de daardoor veroorzaakte afneming in giftigheid duidelijker voor den dag gekomen zou zijn, indien zij van sterker werkend maagsap hadden gebruik gemaakt, dan zij konden bereiden met pepsine uit den handel.

Immers bij de twee bovenbeschreven proeven, door mij met zéér krachtig maagsap genomen, blijkt deze afneming zeer duidelijk.

Opmerkelijk is het, dat de vloeistof, toen ze nog sporen van agglutinine bleek te bevatten, ook nog een geringe vergiftige werking uitoefende, terwijl zij na het verdwijnen der agglutinine volkomen onschadelijk was.

Deze proeven staan slechts alleen, kunnen dus niet als beslissend gelden. Indien echter bij herhaald onderzoek blijkt, dat de vergiftige en de agglutineerende eigenschappen steeds parallel met elkaar verdwijnen door krachtige digestie met maagsap, dan zou niet meer de gecompliceerde hypothese van *Jacoby* noodig zijn, om te verklaren waarom één en dezelfde hoeveelheid immuunserum zoowel de agglutineerende als de vergiftige werking na digestie kon opheffen.

Bij het gebruik van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ om 't extract neer

te slaan, blijft er in 't preparaat altijd een zekere hoeveelheid van dit zout achter, dat een nadeeligen invloed op de pepsine-digestie heeft. 't Was dus te verwachten, dat, indien men dit zout vermeed, de digestie vlugger zou plaats grijpen. De proef werd daarom herhaald met de stoffen, op de in het vorige hoofdstuk herhaaldelijk beschreven wijze bereid.

Een gedroogd bewaarde hoeveelheid nucleoproteïde werd gebracht in 0,2 % HCl, waarin zij slechts ten deele oploste. Na filtratie werd deze oplossing voor digestie gebruikt. Na koken en toevoegen van NaCl leverde de oplossing een aanzienlijk neerslag.

Een deel van deze vloeistof werd gemengd met maagsap. Na alkalisch maken gaf de vloeistof sterke agglutinatie in paardenbloed.

Na 2 × 24 uur digestie was de werking op paardenbloedlichaampjes niet meer te verkrijgen, nadat de vloeistof van het precipitaat, bij digestie ontstaan, bevrijd en daarna geneutraliseerd was.

De neutrale vloeistof werd nu op 2 % NaCl gebracht en in een waterbad verhit. Bij 75° kwam er een geringe opalescentie.

Een ander deel van dezelfde vloeistof werd na oplossen in 0,2 % HCl en toevoeging van $\frac{1}{3}$ volume hondenmaagsap gedigereerd.

Een gedeelte van de oplossing werd echter zonder maagsap gelaten en vermengd met $\frac{1}{3}$ volume 0,2 % HCl.

V bedroeg 1000.

Na 3 × 24 uur bedroeg in de contrôle V eveneens 1000, terwijl de met maagsap gedigereerde portie geen werking vertoonde.

Na neutralisatie en filtratie kwam bij koken slechts geringe opalescentie.

Een weinig versch bereide globulineachtige stof werd opgelost in 0,2 % HCl en hondenmaagsap toegevoegd.

Na zwak alkalisch maken van het mengsel bedroeg V 5000.

Na 24 uur was er nog een spoor van werking, na 2×24 uur was alle agglutinine verdwenen.

Bij koken bleek er geen coagulabel eiwit meer aanwezig te zijn.

De agglutineerende stof blijkt dus niet bestand te zijn tegen krachtige digestie met maagsap. In de proef waarbij een pepsine uit den handel gebruikt werd, die in werking verre achterstaat bij het maagsap van den hond, bleek slechts een verzwakking, terwijl bij aanwending van dit laatste in alle proeven totaal verdwijnen van de werking geconstateerd werd.

Müller kwam tot dezelfde uitkomst met pepsine uit den handel. Vermoedelijk vertoonde zijn digestievloeistof toch nog wel eenig agglutineerend vermogen, dat hij echter, met zijn bepaald onvoldoende methode van meten, niet gewaar werd.

Jacoby kon bij digestie, eveneens met pepsine uit den handel, niet alle werking doen verdwijnen. Dit kan twee oorzaken hebben: 1^e. onvoldoende werking van zijn pepsine, 2^e. de aanwezigheid van veel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in de gebruikte ricine van Merck.

Voor de digestie met trypsine werd geheel gevolgd de methode door *Jacoby* aangegeven, met dit verschil, dat niet ricine van Merck gebruikt werd, doch het precipitaat, verkregen, door een extract met $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ te verzadigen.

Dit precipitaat werd eenige malen met verzadigde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing gewasschen, daarna in water opgelost.

De oplossing werd nu door gefractioneerde precipitatie gezuiverd zooals *Jacoby* voorschrijft. Hierbij werd eerst $\frac{1}{10}$ met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verzadigd. ¹⁾ Het gevormde neerslag is uiterst gering, en vertoont, in water opgelost, sterk agglutineerende eigenschappen.

Het filtraat werd nu $\frac{6}{10}$ verzadigd, waarbij nagenoeg al het eiwit neersloeg. Deze fractie stelt de „gezuiverde” ricine voor.

Wat nu nog bij $\frac{8}{10}$ verzadiging gewonnen wordt, is weder uiterst weinig en werkt sterk agglutineerend. Waarom nu de fractie $\frac{6}{10}$ zuiverder zou zijn dan de overige fracties, is niet goed in te zien, altijd als men 't op de beschreven wijze bereide preparaat uit verse zaden beschouwt. Misschien gedraagt zich de ricine van Merck anders.

De fractie $\frac{6}{10}$ werd nu na wasschen met $\frac{6}{10}$ verzadigd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in water opgelost en nogmaals bij $\frac{6}{10}$ verzadiging neergeslagen, daarna opgelost in water en gedialyseerd.

Door de vloeistof na dialyse te brengen op 1 % NaCl, wordt het gevormde precipitaat weer opgelost. De aldus verkregen oplossing werd voor de digestie gebruikt.

Trypsine-oplossing volgens *Jacoby* werd bereid door

¹⁾ Als verzadigde oplossing werd, volgens den Chemiker-Kalender voor 1892, een opl. van 76 % beschouwd.

een runderpancreas een nacht koel te laten staan, daarna fijn te hakken en met toluolwater bij 37° eenige weken te digereeren. Daarna werd gefiltreerd, het filtraat nog een week in de stoof gelaten, daarna $\frac{6}{10}$ verzadigd met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Het neerslag werd verwijderd en het filtraat verder verzadigd tot $\frac{8}{10}$. Het thans ontstane neerslag werd in water opgelost, nog eens geprecipiteerd, gedialyseerd en ten slotte opgelost in 1 % NaCl.

Van deze oplossing losten 2 cc. bij zwak alkalische reactie een fibrinevlok in een nacht geheel op. Zij vertoonde dus een vrij zwakke werking. Hoewel verscheiden malen getracht werd, op de aangegeven wijze een sterker infuus te bereiden, mocht dit niet gelukken.

Bij het vermengen van de ricine-oplossing met dit trypsinepreparaat ontstond constant een precipitaat. Daar dit wellicht werkzame bestanddeelen van het pancreas bevatte, werd het niet verwijderd, maar in de digestie-vloeistof gelaten. Bij zwak alkalische reactie loste het voor een deel op.

112 cc. oplossing van de „gezuiverde” ricine werden gemengd met 64 cc. trypsine-oplossing, de reactie werd zwak alkalisch gemaakt met soda, en het precipitaat, waarvan boven gesproken is, in de vloeistof gelaten. Na filtratie van een proefje bleek $V = 10^4$.

Na 14 dagen werd V opnieuw bepaald en bleek nog steeds 10^4 te bedragen. Een proefje van de vloeistof werd na filtratie geneutraliseerd en gekookt. Hierbij ontstond vrij veel precipitaat, ook na $\frac{6}{10}$ verzadiging kwam er nog vrij wat neerslag. Dit werd opgelost in water, nogmaals neergeslagen en opgelost, daarna gedialyseerd en de vloeistof op 1,5 % Na Cl gebracht.

Deze vloeistof werkte agglutineerend, gaf echter nog sterke eiwitreacties. Daarom moest ze nogmaals gedigereerd worden.

60 cc. oplossing werden vermengd met 40 cc. pancreas-oplossing; het gevormde precipitaat loste thans bijna geheel op bij zwak alkalische reactie.

V bedroeg in een gefiltreerd proefje 1000.

Na 8 dagen hernieuwde digestie was V nog steeds 1000, zelfs na 14 dagen kon niet de minste afnemng gevonden worden; na neutralisatie werd thans weer $\frac{6}{10}$ met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ verzadigd en na wasschen het neerslag in water opgelost.

Met de oplossing werden nu eiwitreacties gedaan.

De biureetreactie leverde een fraaie violette verkleuring, evenzeer was de gele kleur der xanthoproteïne-reactie duidelijk; koken met Millon's reagens gaf een duidelijke steenroode kleur aan het gevormde precipitaat.

Het was dus niet gelukt, de uitkomst van *Jacoby* te bevestigen, voor zooverre hij de eiwitreacties door digestie met pancreas kon doen verdwijnen. Dit was echter toe te schrijven aan de zwakke werking van het gebruikte preparaat. Het bleek nu, dat het pancreas-infuus in toto veel beter werkte, dan datgene, waaruit de fractie $\frac{6}{10}$ verwijderd was. Daarom werd de proef herhaald met dit infuus in zijn geheel, en tevens getracht, door toevoegen van 1 % soda, de omstandigheden voor digestie zoo gunstig mogelijk te maken. Deze methode nu had schijnbaar groot succes:

Nucleoproteïde werd opgelost in 1 % soda; bij

30 cc. oplossing gevoegd 60 cc. pancreasinfuus dat 1% soda bevatte.

Vóór digestie was V in het mengsel = 5 à 6000.

Na 5 dagen was V gedaald tot 10.

Na 7 dagen was geen werking meer aan te toonen.

Tevens bevatte de vloeistof na neutralisatie geen door hitte coaguleerbaar eiwit meer.

Deze proef, die de vatbaarheid der agglutinine voor digestie met trypsine scheen te bewijzen, leverde, herhaald met globuline, dezelfde uitkomst.

Het was tevens interessant te zien, of, wanneer de agglutineerende werking zeer verzwakt was, er nog een stof in de vloeistof aanwezig was, die bij 80° coaguleerde. Bij een volgende proef werd hierop speciaal gelet.

Een weinig globuline werd opgelost in 1 % soda, en de oplossing vermengd met pancreasinfuus van hetzelfde sodagehalte.

V vóór de digestie = 2000.

na 3 dagen „ = 200.

Nu werd de digestievloeistof voor een gedeelte geneutraliseerd, en op een waterbad verhit.

Bij 68° kwam er een precipitaat. Toen dit echter afgefiltreerd was, bedroeg V nog 200; het vermoeden lag nu voor de hand, dat de gecoaguleerde stof uit het pancreas afkomstig was. Inderdaad bleek het infuus, na neutralisatie, bij 68° à 69° een coagulum te geven, daarboven helder te blijven. De omstandigheden waren dus gunstig, om in de digestievloeistof een bij 80° coaguleerbare stof te herkennen, die bij verdere

verhitting inderdaad nog in geringe mate aanwezig bleek.

Nadat de digestievloeistof $\frac{3}{4}$ uur op 82° gehouden was, had zij alle werking op bloedlichaampjes verloren.

Het andere gedeelte van de digestievloeistof werd bij $\frac{6}{10}$ verzadiging neergeslagen, en leverde daarbij slechts een uiterst gering precipitaat. Na eenige uren staan werd dit op een klein filter afgefiltreerd, daarna opgelost in weinig water. Na toevoeging van een gelijk volume pancreasinfuus met 1 % sodagehalte, werd opnieuw gedigereerd.

Na 34 dagen was alle werking verdwenen. Toen werd de vloeistof geneutraliseerd en gekookt, waarbij zij helder bleef.

Deze vermindering in werkzaamheid, waarmee gepaard gaat een vermindering van de eiwitstof, die bij 80° coaguleert, werd herhaaldelijk geconstateerd, wanneer de vloeistof gedigereerd werd bij alkalische reactie door toevoegen van 1 % soda. Zij bleek voor 't allergrootste deel, zoo niet geheel, aan 't alkali te wijten te zijn, zooals uit contrôleproeven bleek.

3 cc. globulineoplossing in 1 % soda vermengd met 3 cc. pancreasinfuus met 1 % soda.

V	vóór	de digestie	=	9000.
„	na 5 dagen	„	=	4000.
„	11 dagen	„	=	1000.

Tegelijk werd gedigereerd;

3 cc. glob.oplossing in 1 % soda met 3 cc. 1 % soda, zonder pancreas.

V	vóór de digestie	=	9000.
"	na 5 dagen	"	= 6000.
"	" 11	"	= 1000.

De toevoeging van pancreasinfuus maakt dus niet veel verschil.

Daar de trypsineoplossing volgens *Jacoby* bereid, hetzij gebruikt in toto, hetzij op de aangegeven wijze gefractioneerd, geen zeer krachtige werking vertoonde, kon het onaangetast blijven van de agglutineerende werking en het behouden blijven van het eiwit bij neutrale of zwak alkalische reactie, wel worden toegeschreven aan de aanwending van weinig werkzame trypsine.

Misschien zou het gelukken, de eiwitreacties weg te krijgen, en zoo *Jacoby's* resultaten te bevestigen, door een krachtiger enzym te vervaardigen. Dit werd beproefd, door volgens de methode, door *Vernon* ¹⁾ aangegeven, een glycerine-extract te maken van varkenspancreas.

Dit extract was veel werkzamer dan het te voren gebruikte, daar een fibrinevlok in 5 cc. water + 5 cc extract bij zwak alkalische reactie binnen een uur geheel verdween bij 37°.

Echter had dit extract nog niet de grootst mogelijke mate van werkzaamheid. Deze werd ook niet verkregen bij hernieuwde bereiding volgens de genoemde methode. Bij het vervaardigen van meer preparaten, zou het zonder twijfel gelukken een extract te krijgen, dat zeer krachtig werkte. De tijd ontbrak mij echter, om veel extracten te bereiden, daarom

¹⁾ Journal of Physiology, Vol. 27 No. 4, pag. 269.

moest ik mij tevreden stellen met een matig sterk werkzame trypsine-oplossing.

Hoewel nu de kracht van de trypsine-oplossing veel grooter was, waren de uitkomsten der proeven geen andere als te voren.

Door digereeren bij neutrale reactie kon geen vermindering van het agglutinatie-vermogen bewerkt worden. Bij alkalische reactie nam de werkzaamheid wel af, echter niet in sterker mate dan door digestie met soda alleen.

De volgende proeven doen dit uitkomen:

Proef I.

4,5 cc. globuline opgelost in 0,9 % NaCl + 2 cc. pancreas-extract bij volkomen neutrale reactie gedigereerd bij 37° gedurende 5 dagen.

V voor digestie = 10⁵.

V na „ = 10⁵.



Proef II.

10 cc. globulineoplossing in 1% soda + 6 cc. pancreas extract met 1% soda-gehalte gedigereerd bij 37° gedurende 5 dagen.

V voor digestie = 9000.

V na „ = 4000.



Proef IIIa.

7 cc. globuline-opl. in 1% soda + 1 cc. pancreas-extract bevattende 1% soda, gedigereerd gedurende 7 dagen.

V voor digestie = 30.000.

V na „ = 100 of 200.

IIIb.

7 cc. globuline-opl. in 1% soda + 1 cc. 1% soda
gedigereerd gedurende 7 dagen.

V voor digestie = 30.000.

V na „ = 100 á 200.

Door digestie gedurende slechts twee dagen wordt
ook bij alkalische reactie geen afneming gevonden :

Proef IV.

5 cc. versch extract van zaden + 5 cc. pancreas-
extract worden met soda op een gehalte van 1% ge-
bracht.

V voor digestie = 10.000.

V na 2 dagen = 10.000.

Tevens bevatte de vloeistof na neutraliseeren nog
coagulabel eiwit, zooals bij koken bleek.

Het digereerend vermogen was, ook na afloop van
de proef, nog sterk, want een fibrinevlok in de di-
gestievloeistof gebracht, werd in een uur opgelost.

Het was nu de vraag, hoe het bij de digestie met
dit krachtiger werkend enzym ging met de hoeveel-
heid eiwit; meer bepaald, of in de vloeistoffen, die na
digestie een afneming in agglutatievermogen ver-
toonden, ook een vermindering van het eiwitgehalte
had plaats gehad, die aansprakelijk kon gesteld worden
voor de vermindering in werking.

Tevens moest worden uitgemaakt, of de oplossingen,
die na digestie haar vorige werkzaamheid behouden
hadden, ook nog de volle hoeveelheid eiwit bevatten.

De vorige proeven vereischten hiertoe een herhaling

met oplossingen van bekend gehalte aan eiwit; tevens moest rekening gehouden worden met het eiwitgehalte van het pancreas-extract na de digestie.

Een hoeveelheid versch bereide globuline werd opgelost in 1 % soda.

Van 10 cc. oplossing werd het gehalte aan eiwit bepaald, door coaguleeren bij koken in een waterbad bij zeer zwak zure reactie. Daarna werd het coagulum op een gewogen aschvrij filter gebracht, en met kokend water uitgewasschen. Na drogen werd het filter opnieuw gewogen. De gewichtsvermeerdering gaf de hoeveelheid eiwit aan. Deze bedroeg in 10 cc. 55,8 mG.

Nu werd 10 cc. van deze vloeistof vermengd met 6 cc. pancreas-extract. In het mengsel bedroeg V 90,000.

Tegelijk met dit mengsel werd nu gedigereerd 10 cc. 1 % soda + 6 cc. pancreas-extract.

Na 6 dagen bedroeg V nog slechts 40,000; nu werd in 10 cc. door coaguleeren bij zeer zwak zure reactie in een waterbad, de hoeveelheid eiwit bepaald. Deze bedroeg 19,7 mG.

Het geheele digeraat (= 16 cc.) moest dus bevatten $\frac{16}{10} \times 19,7 = 31,5$ mG. eiwit.

Het pancreasextract met soda alleen gedigereerd, bleek na bepaling evenals boven, 6,8 mG. eiwit te bevatten. Deze hoeveelheid moest dus worden afgetrokken van de 31,5 mG. in het digeraat van de ricineoplossing nog aanwezig, die dus hiervan nog 24,7 mG. bevatte.

De uitkomst der proef is dus:

Eiwit in 16 cc.	V =
vóór digestie 55,8 mG.	90,000
na digestie 24,7 "	40,000.

Zij is dus niet in strijd met de veronderstelling, dat de globuline-achtige stof de agglutinatie teweeg brengt.

Op gelijke wijze werden nog eenige bepalingen gedaan van agglutineerende werking en gehalte aan coagulabel eiwit vóór en ná digestie. De resultaten werden nog iets meer betrouwbaar gemaakt, door te zorgen, dat de coagulatie in alle vloeistoffen bij hetzelfde zuurgehalte plaats vond, door na neutralisatie bij elk, naar verhouding gelijke, hoeveelheden zeer verdund azijnzuur te voegen.

De uitkomsten waren:

PROEF a.

Eiwit in 10 cc.	V.
vóór digestie 23,3 mG.	20,000
ná digestie 12 "	8,000.

PROEF b.

Eiwit in 10 cc.	V.
vóór digestie 16 mG.	10 à 20,000
ná digestie 9,1 "	3 à 4,000.

Bij de laatste drie proeven bleek weer een parallel verloop van de afneming in eiwitgehalte en agglutineerende werking, door digestie bij alkalische reactie. Het is onverschillig, of deze afneming een gevolg is van de trypsine of van het alkali alleen; het komt er hier slechts op aan te bewijzen, dat vermindering van het gehalte aan coagulabel eiwit de vloeistof op evenredige wijze doet verliezen aan agglutineerende werking.

Het bleek nu ook omgekeerd, dat, indien bij digestie bij neutrale reactie de hoeveelheid eiwit geen noemenswaarde vermindering ondergaat, de agglutineerende werking evenmin een afneming vertoont, die met de gebruikte methode is aan te toonen.

Een oplossing van globuline in 0,9 % NaCl werd met pancreas-extract vermengd. De waarde voor V bedroeg 100.000, de hoeveelheid eiwit in 4,4 cM³ 13 mG. Na 10 dagen digestie bij neutrale reactie werd voor V nog steeds de waarde 100,000 gevonden. De hoeveelheid eiwit in 4,4 cM³ bedroeg thans 11 mG.

Verkeerde ik bij het nemen der proeven met maagsap, door het materiaal, waarover ik mocht beschikken, in gunstiger conditie dan *Jacoby* en *Müller*, bij de voortzetting dier proeven met pancreas waren de omstandigheden zeer te mijnen ongunste, daar ondanks alle pogingen de verkregen extracten slechts matige werkzaamheid vertoonden.

Dat bij mijn proeven niets gebleken is van een verteerd worden der agglutineerende stof door trypsine, geeft onder deze omstandigheden geen recht, te zeggen, dat deze werking niet bestaat.

Jacoby en *Müller* hebben evenmin bewezen, dat trypsine de agglutineerende stof in 't geheel niet aangrijpt, daartoe waren hunne methoden van meten dier werking veel te onnauwkeurig. Wel is het *Jacoby* gelukt aan te toonen, dat het eiwit uit de ricine uit zijn digestie-vloeistof op sporen na verdwenen was, terwijl toch de vloeistof nog sterk agglutineerend werkte.

Daarmede is echter niet gezegd, dat die agglutineerende werking niet veroorzaakt werd door eiwit, zoolang een nauwkeurige opgave ontbreekt van de grootte van dat agglutineerende vermogen. In zijn stuk geeft *Jacoby* haar op als maximaal, zonder meer.

De vraag is slechts: kan een oplossing van de in de vorige bladzijden beschreven globuline zóó sterk verdund worden, dat zij slechts sporen van eiwit-reacties vertoont, en dan toch nog sterk samenklevend op bloed werken? Op die vraag mag het antwoord bevestigend luiden, zooals uit het volgende blijkt.

Van een oplossing van globuline in 0,9 % NaCl werd het gehalte bepaald, vervolgens nagegaan bij welke verdunning de reacties op eiwit twijfelachtig uitvielen. Het bleek nu, dat bij een gehalte van 0,2 mG. per cc. deze reacties geen twijfel konden overlaten aan de aanwezigheid van eiwit, doch dat bij 0,1 mG. per cc. de oplossing beantwoordde aan de beschrijving, die *Jacoby* van zijn vloeistof geeft.

Bij koken bij neutrale reactie vertoonde zij slechts geringe opalescentie.

De biureetreactie viel negatief uit.

Bij koken met salpeterzuur en daarna toevoegen van ammonia kwam er geen gele verkleuring.

Voegt men nu 1 cc. van de zoodanig verdunde

globulineoplossing bij 9 cc. bloedmengsel, dan ontstaat binnen enkele minuten volkomen aaneenkleaving van alle bloedlichaampjes, na filtratie is de doorgevoerde vloeistof volmaakt helder.

Het verschijnsel der agglutinatatie overtreft dus in gevoeligheid de gewone scheikundige reacties op eiwitverre.

Neemt men nu in aanmerking, dat de zooveel mogelijk gezuiverde globuline het vermogen, om bloedlichaampjes te doen aaneenkleven, in zeer sterke mate bezit, en dat oplossingen van ricine van dit vermogen beroofd worden juist onder die omstandigheden, waaronder de daarin aanwezige globuline vernield wordt: verhitting op 80°, digestie met maagsap of met soda, dan is er, naar ik meen, alle grond om aan te nemen, dat het agglutineerend vermogen aan de globuline zelf, en niet aan andere, niet tot de eiwitstoffen behorende, bestanddeelen van de onzuivere ricine gebonden is.



Indien men mijne conclusie aanvaardt, dat de agglutinine een eiwitstof is, en daarbij een voorstander is van de hypothese der identiteit van toxine en agglutinine, komt men in botsing met *Jacoby*, daar deze ten sterkste ontkent, dat de toxine een eiwitstof zou kunnen zijn.

En voor de meening, dat vergiftigheid en agglutinatievermogen eigenschappen zijn van dezelfde stof, pleiten vele waarnemingen. Vooreerst die van *Erlich*, dat éénzelfde hoeveelheid immuunserum beide werkingen opheft. Dan pleit daarvoor, dat volgens *Rehns* ¹⁾ in verdund bloed het filtraat alle giftige werking verliest, wanneer de lichaampjes alle agglutinine tot zich genomen hebben. Ook het parallel verloop der afnemering in agglutineerende en in toxische werking

¹⁾ Comptes rendus d.l. Société de Biologie, 1902, No.3 pag. 89.

bij verhitting op 80° en bij digestie met maagsap pleiten zeer voor de identiteit, hoewel deze laatste waarnemingen herhaling behoeven en bevestiging.

Indien nu de agglutinine een eiwitstof is, die identisch is met de toxine, dan moet zij haar doodelijke werking bij een ongelooflijk kleine dosis ontvouwen, indien de cijfers van *Jacoby* juist zijn.

Immers de vloeistof, door hem na digestie en precipitatie met $\frac{6}{10}$ verzadiging met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ verkregen, bevatte per cc. 43 doodelijke doses. Zij kon, zooals boven vermeld is, per cc. hoogstens 0,1 mG. van de globuline bevatten. Eénmaal de doodelijke dosis van deze zou dus moeten bedragen 0,0023 mG. per KG. konijn. Bij een zestal konijnen werd nu nagegaan, of de globuline een dergelijke buitengewone werking heeft.

Ingespoten werd per KG. konijn respectievelijk;

0,0025	milligram
0,004	"
0,007	"
0,016	"
0,05	"
0,1	"

Slechts het laatste konijn bezweek binnen 3×24 uur, met haemorrhagien in maag en Peyersche plaques, de overige vertoonden allen zwelling op de plaats van injectie, die na eenige weken weer verdween.

Door aan te nemen, dat er in *Jacoby's* vloeistof nog sporen globuline aanwezig waren, zoo gering, dat ze nauwelijks eiwitreacties meer gaven, kan men dus de groote concentratie van het vergift niet verklaren.

Indien de globuline de vergiftige stof was, zou er in de oplossing slechts één keer de doodelijke dosis

kunnen voorkomen. De onzekerheden bij de bepalingen van *Jacoby* zijn echter niet groot genoeg, om het verschil tusschen één en 43 te verklaren.

Bovendien, indien de vloeistof ook slechts weinige malen de doodelijke dosis bevatte, b. v. 3 of 4 maal, dan zou de hoeveelheid globuline 0,3 of 0,4 mG. per cc. bedragen, welke hoeveelheid niet aan de waarneming kan ontsnappen.

De hypothese dat de beschreven globuline tenminste de draagster der agglutineerende werking zou zijn, scheen voldoende gewettigd om het de moeite waard te doen zijn, de samenstelling dezer stof na te gaan.

Een zekere hoeveelheid werd op de vroeger beschreven wijze bereid, en door driemalige precipitatie gezuiverd. Nadat van elke portie was nagegaan, of ze slechts één coagulatie-temperatuur bezat, en wel bij 80°, indien de stof was opgelost in 2 % NaCl, werd ze boven zwavelzuur in vacuo gedroogd.

Het aschgehalte bleek nu zoo hoog te zijn, dat het een beletsel vormde voor de analyses, nl. 31 %. De asch vertoonde de reacties van Ca en P.

Door uittrekken van de droge stof met zwak azijnzuur, kon naast veel eiwit ook phosphorzuur aangetoond worden in 't filtraat. Bij de bereiding was dus een deel van het rijkelijk in de zaden aanwezige calciumphosphaat met de stof meegegaan.

Door uittrekken met verdund zuur kon dit niet verwijderd worden, daar de stof zelf daarin oploste. Indien men vóór het uittrekken de stof coaguleerde met alcohol, liep men gevaar, haar zoodanig te veranderen, dat er door 't zuur deelen uit verwijderd konden worden.

Beproefd werd nu, het aschgehalte te verminderen

door dialyse bij zure reactie. Daar de stof bij digestieproeven zich voldoende resistent tegen HCl getoond had, werd dit zuur bij de dialyse gebruikt.

Nadat uit een gedialyseerd extract door zuur de nucleoproteïde verwijderd was, werd door neutralisatie de gewenschte stof gewonnen en deze daarna opgelost in 0,1 % HCl. Vervolgens werd zij gedurende 24 uur gedialyseerd tegen herhaaldelijk ververscht zuur van dezelfde sterkte. Zij bleek daarbij voor een deel te precipiteeren, welk precipitaat door een weinig zout weer kon worden opgelost.

Ook bij afstoppen der zure reactie kwam er een neerslag, dat bij toevoegen van nog meer alkali, tot bijna neutrale reactie, weer verdween. Blijkbaar loste de stof dan weer op in het gevormde zout.

Het bij afstoppen der zure reactie verkregen precipitaat werd nu in zoo weinig mogelijk alkali opgelost, om na te gaan, of na de bewerking de werkzaamheid op bloed dezelfde gebleven was.

De oplossing bleek te bevatten 5,2 m.G. eiwit per cc. en werkzaam te zijn bij 40,000 ¹⁾ malige verdunning, hetgeen met vroeger gevonden waarden goed overeenstemt. Ook bleek de bewerking het gewenschte resultaat gehad te hebben, daar het aschgehalte van de stof thans nog slechts 8 % bedroeg. Het was te verwachten, dat bij langer dialyseeren dit aschgehalte nog kleiner zou worden. Dit gebeurde inderdaad.

119.1 mG. stof door dialyse gedurende 3×24 uur tegen 0,1 % HCl van zouten gezuiverd, leverde nog slechts 1,1 mG. asch, zonder dat de werking op bloed minder geworden was.

De aldus bereide stof bleek echter niet te voldoen aan den eisch, slechts één coagulatiepunt te vertoonen.

¹⁾ Men houde in 't oog, dat bij de bepaling op de beschreven wijze eenige onzekerheid heerscht.

Daarom werd eerst door oplossing in alkali en neerslaan bij neutraliseeren op de gewone wijze een preparaat vervaardigd, dat slechts bij 80° coaguleerde na oplossing in 20% zout; daarna werd het aschgehalte verkleind door oplossen in zoutzuur 0,1% en dialyseeren tegen hetzelfde zuur gedurende twee dagen.

Na nogmaals 24 uur gedialyseerd te zijn tegen gedestilleerd water was de stof in den dialysator grootendeels geprecipiteerd, en werd verzameld. Een proefje in 20% NaCl opgelost gaf slechts bij 83° coagulatie, d. i. een weinig hooger dan vóór de zuivering.

Een oplossing van deze stof in 20% zout bevatte 4,3 mG. per cc. en was nog werkzaam bij 80 tot 90.000 maal verdunnen.

Evenmin schijnt door de dialyse de vergiftige werking te lijden, daar een konijn stierf binnen 3 dagen na subcutane injectie van 0,1 mG. per KG.

Een ander konijn, dat 0,1 mG. van dezelfde stof vóór de dialyse per KG. ontvangen had, werd wel ziek, maar herstelde zich weder.

De bepalingen van het eiwitgehalte geschieden bij beide stoffen door de oplossing tot droog in te dampen, daarna de stof bij roodgloei-hitte te verbranden en het verschil in gewicht tusschen droge stof en asch te bepalen.

Op de beschreven wijze kan men dus de stof voor analyse geschikt maken. Echter blijft er bij de herhaalde precipitatie altijd een deel in oplossing, zoodat de opbrengst slechts gering is. Uit 200 gram gepelde zaden werd een hoeveelheid zuivere stof verkregen, wisselend van 50 tot 100 mG.

Daar een volledige analyse dus een aanzienlijken arbeid zou vereischen, eer het benoodigde materiaal bijeen was, werd alleen nagegaan, of de stof, blijkens de afwezigheid van phosphorus tot de globulinen gerekend mocht worden.

Hiertoe werd in gedeelten een voldoende hoeveelheid stof bereid. Van elke portie werd vóór het drogen een klein deel opgelost in 2 % NaCl ter contróle van het coagulatiepunt. Zonder uitzondering werd slechts coagulatie bij ongeveer 80° verkregen.

Van de bij 110° tot constant gewicht gedroogde stof leverden 193,1 mG. na verbranding bij roodgloeihitte 2.7 mG. asch, = 1,4%.

585,2 mG. droge stof werden volgens *Neumann* met salpeterzuur en zwavelzuur geoxydeerd.

De vloeistofleverde met ammonium-molybdaenaat, na 12 uur bij 37° gehouden te zijn, een geel precipitaat. Door oplossen in NH_3 en praecipiteeren met magnesia mixtuur werd hieruit tripelphosphaat bereid.

Na gloeien werd hieruit verkregen 9.9 mG. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

585.2 mG. stof bevat dus 2.75 mG. P = 0.47%

Deze kleine hoeveelheid phosphorus in een stof, die 1,4 % asch bevat, mag wel worden toegeschreven aan de verontreiniging met anorganische phosphaten.

De stof, die de agglutinatie teweeg brengt, mag dus een globuline genoemd worden. Zij is oplosbaar in zwakke zoutoplossingen. evenzeer in verdunde alkaliën en zuren, in deze laatste het minst. Door verzadiging met MgSO_4 wordt zij slechts bij $\pm 37^\circ$ volledig neergeslagen, bij kamertemperatuur blijven er nog geringe hoeveelheden in oplossing.

De zuivere stof bevat naar alle waarschijnlijkheid geen phosphor.

Eindelijk ligt haar coagulatietemperatuur in een oplossing in 2 % zout bij neutrale reactie bij 80—83°.

Door *Stillmark* was reeds aangetoond, dat het plasma van het bloed geen rol speelt bij de agglutinatie, want, wordt dit door afcentrifugeeren en wasschen van de lichaampjes met 0,9 % Na Cl geheel verwijderd, dan geven de lichaampjes, na opnieuw met 0,9 % Na Cl in suspensie gebracht te zijn, zeer sterke agglutinatie met ricine, even sterk als in de oorspronkelijke vloeistof.

Een aantal proeven werd nu ondernomen, om na te gaan, of er bij de agglutinatie veranderingen waren te zien, die licht zouden kunnen werpen op het wezen van dit verschijnsel. Evenwel hadden zij niet veel resultaat.

Bij de beschouwing onder 't mikroskoop van een druppel bloedsuspensie, waarbij aan den rand van het dekglas een druppel ricine-oplossing gebracht wordt, ziet men de agglutinatie ontstaan.

Op de plaatsen, waar zich de ricine reeds verspreid heeft, ziet men, dat de lichaampjes, wanneer zij, door de strooming bewogen, elkaar aanraken, na de ontmoeting niet meer elk afzonderlijk hun weg vervolgen, maar elkaar vasthouden over een zeker deel van den omtrek, die zich over dat deel afplat. Er vindt echter geen versmelting tot één massa plaats: men kan steeds de scheidingslijn nog waarnemen.

De lichaampjes, die op hun weg niet met andere in aanraking gekomen zijn, vertoonen niets abnormaals.

Aan de samengekleefde lichaampjes kan men niets vinden, dat de aaneenkleaving zou kunnen verklaren.

Evenmin gelukte het, veranderingen waar te nemen na fixatie en kleuring.

De lichaampjes werden hiertoe gesuspendeerd in 0,9 % NaCl, waarbij zooveel ricine gevoegd werd, dat in eenige minuten totale aaneenkleving volgde.

Op verschillende tijden na de vermenging werden nu gedeelten van de suspensie in osmiumzuur, of in formol-Müller gebracht, nl. na 10 sec., 20 sec., 40 sec., enz.

Na kleuring met eosine werd niets abnormaals aan de zeer goed geconserveerde lichaampjes waargenomen. Zij kleurden zich even sterk als niet met ricine behandelde, op gelijke wijze gefixeerde, bloedlichaampjes.

Bij de agglutinatie verandert het volume der lichaampjes niet merkbaar.

10 cc. van een suspensie van runder-bloedlichaampjes in 0,9 % zout werden gedurende 2 uur gecentrifugeerd met 10 cc. 0,9 % zoutoplossing, die een weinig ricine bevatte. Tegelijk werd gecentrifugeerd een zelfde mengsel zonder ricine. Door dit centrifugeren te doen plaats vinden in gelijke, gegradueerde buizen, kon van de laag bloedlichaampjes in beide gevallen het volume vergeleken worden. Dit was bij herhaalde proeven in beide buisjes gelijk, op zeer kleine verschillen na, die nu eens ten gunste van 't eene, dan weer ten gunste van 't andere buisje waren.

Tegenover hypotonische vloeistoffen zijn de lichaampjes even resistent nà als vóór agglutinatie. In 0,8, 0,7 of 0,6 % NaCl gebracht, vindt er geen uittreden van kleurstof plaats. Daarentegen wordt de vloeistof rood gekleurd, wanneer men, hetzij geagglutineerde, hetzij normale, lichaampjes in 0,5 % NaCl brengt.

Indien men bloedlichaampjes brengt in een oplossing van zout van 0,5 ‰, dan staan zij, behalve kleurstof, nog iets anders af. Want centrifugeert men de lichaampjes af, dan brengt ricine in de heldere, roode vloeistof na eenige uren een precipitaat teweeg. In 0,5 ‰ zout met eenige druppels ricine vermengd, komt in denzelfden tijd absoluut geen neerslag.

Het zou nu kunnen zijn, dat in dit neerslag de reden van het samenkleven gelegen was. Men zou zich kunnen voorstellen, dat het ook al ontstond aan de oppervlakte van normale lichaampjes en door zijne klevrigheid deze aan elkander verbond.

Om hieromtrent eenige zekerheid te verkrijgen, werd een zekere hoeveelheid van serum bevrijde lichaampjes gesuspendeerd in 0,5 ‰ NaCl en daarna gecentrifugeerd. Na afschenken van de vloeistof werd opnieuw 0,5 ‰ NaCl toegevoegd en weer gecentrifugeerd. Deze bewerking werd 20 maal in 't geheel toegepast. Tegelijk werd een andere, evengroote portie lichaampjes, van 't zelfde bloed afkomstig als de eerste, op gelijke wijze behandeld met 0,9 ‰ NaCl. Beide porties werden na afloop der bewerking in een evengroot volume 0,9 ‰ NaCl gesuspendeerd. Zij bleken na toevoeging van een gelijke hoeveelheid ricine even volledig en even snel aaneen te kleven.

De vloeistoffen, waarmee de lichaampjes voor de 20ste maal gewasschen waren, gaven beide een duidelijk precipitaat na toevoeging van eenige druppels ricine-oplossing. Echter was dit in de wasch-vloeistof van de lichaampjes, die met 0,5 ‰ NaCl behandeld waren, veel belangrijker, dan in die, welke 0,9 ‰ NaCl bevatte.

Het bleek dus niet mogelijk te zijn, zelfs door 20 maal herhaald uitwasschen, de bloedlichaampjes van de stof die met ricine een neerslag geeft, te bevrijden.

Derhalve kon ook niet het bewijs geleverd worden, dat in deze stof de grond der agglutinatie gezocht moet worden.

Evenmin bleek intusschen het omgekeerde. Want, dat de lichaampjes na herhaald uitwasschen met 0,5 % NaCl nog goed aaneenkleefden, kan berusten op de aanwezigheid van nog een weinig van de stof, die het precipitaat geeft. Immers, indien aan de oppervlakte der lichaampjes ook slechts een weinig kleverig neerslag gevormd wordt, is dit voldoende om ze te doen agglutineeren.

In overeenstemming met deze voorstelling is ook, dat uit de laatste waschvloeistof nog een neerslag gekregen kon worden door ricine toe te voegen. —

STELLINGEN.

I.

De voorstelling van de wijze waarop de accommodatie plaats vindt, zooals Helmholtz die gegeven heeft, kan niet juist zijn.

II.

De secretie van pancreassap, die wordt veroorzaakt door zoutzuur te brengen in den dunnen darm, wordt opgewekt langs reflectorischen weg.

III.

Het primitieve verhemelte ontstaat uitsluitend door de samensmelting van de neus- en bovenkaaks-uitsteeksels.

IV.

De musculus sphincter iridis is van epithelialen oorsprong.

V.

De bloedplaatjes, die in het levende bloed voorkomen, zijn cellen.

—

VI.

De verklaring van het acute longoedeem door verlamming van den linker ventrikel van het hart, terwijl de rechter blijft doorwerken, is onvoldoende.

VII.

Bij de behandeling van phtisici moet het effect van lichaamsbeweging steeds gecontroleerd worden door meten van de temperatuur in het rectum.

VIII.

β -Naphtol verdwijne uit de rij der geneesmiddelen.

IX.

Salicylas natricus en acidum salicylicum worden met voordeel vervangen door aspirine.

X.

De reacties op pentosen behooren toegepast te worden in alle gevallen, waar de gewone reacties op suiker in de urine positief uitvallen.

XI.

Er bestaat een physiologische en een pathologische lactatie-atrophie van den uterus.

XII.

Hypertrophia cordis is geen regelmatig voorkomend verschijnsel bij de zwangerschap.

—

XIII.

Bij vermoedelijke verwonding van de lever is laparotomie en eventueel hechting geïndiceerd.

XIV.

De aanwending van geconcentreerd carbolzuur om geïnfecteerde wonden uit te spoelen verdient aanbeveling.

XV.

De precipitaten aan de achtervlakte van de cornea bij kyklitis, zijn in de meeste gevallen zelfstandige localisaties van de ziektekiemen die de kyklitis teweegbrengen.

XVI.

Het is wenschelijk dat er inrichtingen ontstaan, waarin lijders aan lichte vormen van zielsziekten kunnen geplaatst worden, zonder de formaliteiten en wettelijke gevolgen, die onvermijdelijk zijn bij de opneming in een krankzinnigengesticht.

XVII.

De medicus behoort zich te verzetten tegen wederinvoering van de doodstraf in het burgerlijk strafrecht.

XVIII.

Het onderwijs op gymnasia en hogere burgerscholen is voor lichamelijk en geestelijk gezonde leerlingen niet te bezwarend.
