



De saponine uit de bladeren van *Trevesia sundaica* Miq.

<https://hdl.handle.net/1874/256064>



DE SAPONINE UIT DE BLADEREN VAN
❖ TREVESIA SUNDAICA MIQ. ❖

J. FLIERINGA.



A. qu.
192



De saponine uit de bladeren van
- - Trevesia sundaica MIQ. - -

De saponine uit de bladeren van *Trevesia sundaica* Miq.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD

VAN

Doctor in de Artsenijbereidkunde

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT

OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS

Dr. H. ZWAARDEMAKER

HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE

FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE

TE VERDEDIGEN

op Vrijdag 8 Juli 1910 des namiddags te 1 uur

DOOR

JACOB FLIERINGA

APOTHEKER

geboren te HUIZUM



Electr. drukkerij „de Industrie” J. VAN DRUTEN - Utrecht
1910

AAN MIJNE OUDERS.

Bij dit onderzoek heb ik van U, Hooggeleerde WEFERS BETTINK, zeer geachte Leermeester, groote belangstelling ondervonden. Veel voorlichting heb ik daarbij van U mogen ontvangen. Ik betuig U, aan wien ik ook anderszins veel verplicht ben, daarvoor mijn dank.

Ook U, Hooggeleerde SCHOORL, zeer geachte Promotor, mijn dank. Gij stond mij toe, na het aftreden van Professor WEFERS BETTINK, dit onderzoek onder U voort te zetten. Veel ben ik verschuldigd aan Uw raadgevingen, zoowel bij het verdere onderzoek, als bij het gereed maken van dit proefschrift, en aan Uw groote hulpvaardigheid.

INHOUD.

	Blz.
INLEIDING	1
DE SAPONINE UIT DE BLADEREN VAN TREVESIA SUNDAICA MIQ.	10
Afscheiding der ruwe saponine	11
Onderzoek van de ruwe saponine	16
Behandeling van de ruwe saponine met magnesiumoxydehydraat	20
Onderzoek van de gele saponine	22
Onderzoek van de fracties (van de gele saponine)	28
Verder onderzoek van fractie 1.	38
Splitsing van de saponinen door zuur	44
Inwerking van alkali op de saponine.	57
Fractie 4	69
De groene saponine.	71
SAMENVATTING	72
STELLINGEN	77

INLEIDING.

Aan de mededeeling van mijn onderzoek laat ik, in chronologische volgorde, voorafgaan een overzicht van eenige belangrijke methoden, voor de afscheiding van saponinen gebruikt, en een bespreking van hun belangrijkste eigenschappen.

Er zijn planten, waarvan het waterig aftreksel bij schudden sterk schuimt en als waschmiddel kan gebruikt worden. In vele gevallen wordt deze eigenschap veroorzaakt door glycosideachtige stoffen, die daarom als saponinen worden onderscheiden.

Een zeer oude methode, voor de afscheiding van de saponinen gebruikt, is de *alcoholmethode*.¹⁾ Deze berust daarop, dat vele saponinen in eenigszins verdunden spiritus (80 %) bij kooktemperatuur goed, bij gewone temperatuur moeilijk oplosbaar zijn. De plantendeelen of hun waterige extracten worden met den spiritus uitgekookt, de oplossingen heet gefiltreerd. Bij bekoeling worden saponine bevattende vlokken afgescheiden. Door ompraecipitatie uit kokenden spiritus kan men trachten de saponine verder te reinigen.

De *barytmethode* is het eerst door ROCHLEDER en VON PAYR²⁾ toegepast. Door verschillende onderzoekers was uit den Levantschen zeepwortel (van Gypsophilasoorten), meestal volgens de alcoholmethode, saponine afgescheiden.

¹⁾ Volgens ROSENTHALER (Zwei Streitfragen aus der Geschichte der Saponine. Berichte der deutsch. pharm. Gesellsch. 15 (1905) p. 178) is deze methode ten onrechte dikwijls aan SCHRADER (Gehlens Journal für die Chem. Phys. und Mineral. (1809) p. 548) toegeschreven. De eigenlijke alcoholmethode is eerst door latere onderzoekers als BUSSY (Journ. de Pharm. 19 (1833) p. 1) toegepast.

²⁾ Journal für prakt. Chemie. Bd. 85 (1862) p. 275.

De elementair-analytische samenstelling, gevonden bij de verschillende onderzoeken, stemde echter niet goed overeen.

V. PAYR trachtte nu op de volgende wijze uit saponine, volgens de alcoholmethode verkregen, een zuivere saponine af te scheiden. De saponine werd in weinig water opgelost. Door toevoeging van een overmaat van verzadigd barytwater ontstond een overvloedig praecipitaat, dat afgefiltreerd werd en met barytwater nagewasschen. Dit neerslag kon gemakkelijk in water worden opgelost. Uit de oplossing werd het baryt door inleiden van koolzuur ¹⁾ en verwarmen afgescheiden. Na affiltreeren van het bariumcarbonaat, werd uit het filtraat de saponine met aetherhoudenden alcohol neergeslagen. Deze saponine bevatte meer koolstof en waterstof dan de saponine, volgens de alcoholmethode bereid, waarvan was uitgegaan.

Deze methode is in onbruik geraakt, daar gebleken is, dat de saponine bij de behandeling met barytwater een verandering ondergaat, waardoor zij de giftige eigenschappen grootendeels verliest. ²⁾

Nog sterker treedt deze verandering op bij *acetylmethode*, het eerst toegepast door STÜTZ. ³⁾ STÜTZ ging uit van quillajasaponine, volgens de alcoholmethode uit quillajabast (*Quillaja saponaria* MOL.) afgescheiden. Deze werd geacetyleerd; uit de gezuiverde acetylverbinding werd de saponine terug gewonnen door verwarmen met barytwater. De barytverbinding werd met koolzuur ontleed. De aldus verkregen saponine had nagenoeg dezelfde elementair-analytische samenstelling, als de saponine, waarvan was uitgegaan. Ze was echter niet giftig.

Een groot aantal saponinen is afgescheiden volgens de

¹⁾ Na de ontleding met koolzuur bevat de saponine altijd nog veel barium; door nauwkeurig neutraliseeren met verdund zwavelzuur kan dit echter nagenoeg geheel worden verwijderd.

(KOBERT. Archiv. f. exp. Pathol. und Pharmacol. Bd. 23 (1887) p. 238).

²⁾ KOBERT. l. c. p. 239.

³⁾ Annalen der Chem. Bd. 218 (1883) p. 231.

loodmethode. Deze, ofschoon reeds vroeger toegepast, is eerst door het onderzoek van KOBERT ¹⁾ over de saponinen uit de quillajabast algemeen in gebruik gekomen.

KOBERT had opgemerkt, dat, wanneer de saponine uit de quillajabast werd afgescheiden volgens de alcoholmethode, de alcoholische oplossingen na afzetting van de saponine sterker giftig waren, dan verzadigde alcoholische oplossingen van de neergeslagen saponine. 't Was dus mogelijk, dat er meer dan één saponine aanwezig was. Hij slaagde er in, op de volgende wijze twee saponinen af te scheiden. De tot poeder gebrachte bast werd herhaaldelijk met water uitgekookt; de verkregen uittreksels werden tot een klein volume uitgedampt en na bezinken gefiltreerd. In deze vloeistof gaf loodacetaat een overvloedig, gekleurd praecipitaat, dat werd afgefiltreerd en uitgewasschen. Daarna werd het in water gesuspenderd en met zwavelwaterstof ontleed. Na toevoegen van spiritus (om het filtreren mogelijk te maken) werd het zwavellood afgefiltreerd; dit werd nog een paar maal met sterken spiritus uitgekookt. De filtraten werden uitgedampt tot droog. De bruine verdampingsrest werd uitgekookt met een mengsel van alcohol en chloroform. Hierbij bleef de bruine kleurstof achter, terwijl de saponine in oplossing ging. Uit de oplossing werd de saponine (quillajazuur) met aether neergeslagen.

Uit het kleurloze filtraat, na de praecipitatie met loodacetaat verkregen, werd door praecipitatie met loodazijn ²⁾ een tweede saponine verkregen (quillajasapotoxine).

Quillajazuur en sapotoxine zijn beide giftig. Het quillajazuur reageert zwak zuur en geeft met loodacetaat een neerslag; de sapotoxine reageert neutraal en wordt niet door loodacetaat, maar wel door loodazijn gepraecipiteerd. Ook verschillen ze in elementair-analytische samenstelling.

Volgens de loodmethode zijn uit verschillende planten

¹⁾ Archiv. f. exp. Pathol. und Pharmacol. Bd. 23 (1887) p. 240.

²⁾ d. i. $\pm$ half-basisch loodacetaat.

twee saponinen afgescheiden, uit andere is slechts één afgescheiden, niet praecipiteerbaar door loodacetaat maar wel door loodazijn, uit enkele slechts één saponine, praecipiteerbaar door loodacetaat.

Door BOORSMA is de *methylicalcoholmethode* ¹⁾ aangegeven, die zeer algemeen kan worden toegepast, dikwijls ook in gevallen, waarin de loodmethode voor de afscheiding der saponine niet geschikt is. De plantendeelen worden uitgetrokken met methylicalcohol, die voor vele saponinen een beter oplosmiddel is dan aethylalcohol. Van het uittreksel wordt het grootste deel van de methylicalcohol afgedistilleerd. Dan wordt de saponine met aether neergeslagen. De saponine wordt in chloroformwater opgenomen en gedialyseerd (de saponinen dialyseeren moeilijk), waardoor o. a. de suikers, die de saponinen gewoonlijk begeleiden, worden verwijderd. Het dialysaat wordt uitgedampt tot droog; de droogrest wordt opgenomen in methylicalcohol. Uit de gefiltreerde oplossing wordt de saponine met aether neergeslagen.

De aldus verkregen saponinen bevatten soms nog looizuren en kleurstoffen. Hiervan kunnen ze dikwijls door behandeling met magnesiumoxyde (zie blz. 5) worden bevrijd. Ook bij het uitkoken met mengsels van alcohol en chloroform blijven dikwijls bijmengsels achter.

Met de loodmethode kan men beproeven, of er één of meer saponinen aanwezig zijn.

Een *ammoniumsulfaatmethode* is afkomstig van KOBERT. ²⁾ Vele saponinen worden door ammoniumsulfaat meer of minder gemakkelijk uitgezouten, andere niet. Van de twee saponinen van quillajabast wordt bijvoorbeeld quillajazuur gemakkelijk uitgezouten, quillajasapotoxine in 't geheel niet.

Hierop baseert KOBERT de volgende methode voor de scheiding en afscheiding van deze stoffen:

¹⁾ Mededeelingen uit 's Lands plantentuin N^o. 52 (1902) p. 30.

²⁾ KOBERT. Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen (1904) p. 23.

De gefiltreerde en geconcentreerde afkooksels uit den bast verzadigt men met ammoniumsulfaat en kookt dan eenige minuten. Daarbij ontstaat een goed samenpakkend neerslag, dat alle bastkleurstof en het quillajazuur bevat, terwijl het kleurlooze filtraat de sapotoxine bevat. Dit filtraat wordt gedeeltelijk uitgedampt. Aan de warme vloeistof wordt een rijkelijke hoeveelheid alcohol toegevoegd. Het neergeslagen ammoniumsulfaat wordt afgefiltreerd. Uit het bekoelde filtraat wordt de sapotoxine met aether neergeslagen als een wit poeder. Het neerslag, dat quillajazuur bevat, wordt afgeperst en uitgekookt met alcohol. Na afkoeling wordt het quillajazuur met aether neergeslagen.

Een hulpmiddel bij de reiniging van saponinen is ook de als *magnesiamethode* bekende behandeling. Het beginsel hiervan is het eerst toegepast door GREENE ¹⁾ bij de afscheiding van de chamaelirine uit den wortel van *Chamaelirium luteum* LILIAC.

De op één of andere wijze verkregen saponine wordt in water opgelost en met magnesiumoxyde tot droog uitgedampt. De droogrest wordt met alcohol of methylalcohol uitgekookt, waarin de saponine overgaat, terwijl verontreinigingen in het magnesiumoxyde achterblijven.

Ook door koken van de alcoholische oplossing met versch gepraecipiteerd *loodhydroxyde* ²⁾ kan de saponine soms gereinigd worden.

Verder wordt ook *dierlijke kool* voor de ontkleuring gebruikt.

De saponinen zijn glycosiden, die bij splitsing geven suiker en een in water onoplosbare stof, de sapogenine.

Ze hebben in meerdere of mindere mate colloïde eigenschappen. De meeste saponinen zijn niet kristallijn verkregen. In water lossen ze meestal in alle verhoudingen op; sommige zure saponinen evenwel eerst helder na toevoeging van alkali.

¹⁾ Americ. Journ. of Pharm. vol 50 (1878) p. 250 en 465; naar KOBERT. Saponinsubst. p. 5.

²⁾ ROSENTHALER. Arch. der Pharm. Bd. 240 (1902) p. 60.

Deze oplossingen kunnen fijne vaste deeltjes zwevend houden en vetten emulgeeren. De verdunde waterige oplossingen schuimen bij schudden. De saponinen dialyseeren meestal moeilijk. Vele kunnen met ammoniumsulfaat worden uitgezouten. Ze kunnen kleurstoffen adsorbeeren.

Eenige saponinen zijn kristallijn verkregen, zooals parilline ¹⁾ (uit sarsaparillewortel), digitonine ²⁾ (uit de zaden van *Digitalis purpurea* L) en melanthine ³⁾ (uit de zaden van *Nigella sativa* L). Deze drie stoffen lossen moeilijk in koud water op, beter in sterken alcohol. De oplossingen in water schuimen sterk bij schudden. Ook door hun physiologische en haemolytische eigenschappen sluiten ze zich bij de saponinen aan.

De kristallijne sarsasaponine ⁴⁾ (uit den sarsaparillewortel) is gemakkelijk oplosbaar in water, evenals de meeste saponinen moeilijk oplosbaar in alcohol. Ze is sterk haemolytisch, de oplossingen in water schuimen sterk bij schudden.

Vele saponinen geven met verzadigd barytwater een neerslag, in water oplosbaar. Dit werd vroeger als een algemeene eigenschap van saponinen beschouwd. Later is echter gebleken, dat bijv. in vele Sapotaceen ⁵⁾ glycosiden voorkomen, die zich in vele opzichten bij de saponinen aansluiten, maar die met barytwater geen neerslag geven.

Sommige saponinen (saponinezuren) geven met normaal loodacetaat een neerslag, de meesten eerst met loodazijn. Die welke met barytwater geen neerslag geven, geven ook met geen van deze beide reagentia een praecipitaat.

Met zwavelzuur overgoten, geven ze na eenigen tijd roodachtige verkleuringen.

Vele saponinen zijn in meerdere of mindere mate vergiftig. In kleine doses prikkelen ze het protoplasma, in grootere dooden ze het. ⁶⁾

¹⁾ FLÜCKIGER. Arch. der Pharmacie Bd. 210 (1877) p. 532.

²⁾ KILIANI. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 24 (1891) p. 339.

³⁾ V. SCHULZ. Arb. Dorpater Pharm. Inst. Bd. 14. (1896) p. 111.

⁴⁾ V. SCHULZ. Arb. Dorpater Pharm. Inst. Bd. 14 (1896) p. 1.

⁵⁾ BOORSMA. Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin N^o. 52 (1902) p. 85.

⁶⁾ KOBERT. Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. (1904) p. 14.

In 't bijzonder werken ze prikkelend op klieren en slijmvliezen. Het poeder, in de neus gebracht, veroorzaakt niezen en sterke slijmafscheiding.

In een achterpoot van een kikvorsch ingespoten, veroorzaken ze verlamming en gevoelloosheid van dit lichaamsdeel; ze vernielen de periphere gevoels- en bewegingszenuwen en de spieren, waarin ze worden ingespoten. Deze proef werd vroeger veel als physiologische reactie op saponinstoffen gebruikt.

Losse cellen van hersenen en ruggemerg, lever en nieren worden door de saponinen tot onherkenbaarheid veranderd. Ook op roode bloedlichaampjes werken ze oplossend. Een mengsel (1:100) van gedefibrineerd bloed en physiologische keukenzoutoplossing is een zeer gevoelig reactief op vele saponinen; de bloedlichaampjes worden zonder aglutinatie en zonder vorming van methaemoglobine opgelost, zoodat er een lakkleurige, heldere vloeistof ontstaat (haemolyse).

Volgens KOBERT ¹⁾ is het waarschijnlijk, dat de haemolyse veroorzaakt wordt, doordat de saponine tot zich trekt de lecithine en de cholesterine uit het stroma van de bloedlichaampjes, waardoor deze uiteenvallen.

RANSOM ²⁾ heeft n.l. gevonden, dat quillajasapotoxine, eenige uren met cholesterine (in aether opgelost) gedigereerd, niet meer haemolytisch was. KOBERT bereidde een in water oplosbare, niet haemolytische en niet giftige verbinding van quillajasapotoxine en cholesterine. Door WINDAUS ³⁾ werd een kristallijne, niet haemolytische en niet giftige verbinding van digitonine en cholesterine verkregen.

Cholesterine is dus een tegengift tegen saponine. Dit verklaart ook het verschijnsel, dat bloedlichaampjes in verdund bloed moeilijker ontleed worden, dan bloedlichaampjes, opzettelijk bevrijd van het cholesterine bevattende serum.

KOBERT vond ook, dat sapotoxine lecithine oploste. De

¹⁾ KOBERT. Beiträge z. Kenntnis der Saponinsubst. p. 50.

²⁾ Deutsche med. Wochenschr. Bd. 27. (1901) p. 194.

³⁾ Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 42. (1909) p. 240.

sapotoxine verliest hierbij haar giftigheid en haemolytisch vermogen niet.

Als een reactie op giftige saponinestoffen komt nog in aanmerking de bedwelmende werking, die verdunde oplossingen op visschen uitoefenen.

Al de saponinestoffen zijn niet even vergiftig en haemolytisch; sommige, zooals guajak-saponine en -saponinezuur, bijna in 't geheel niet. Ook de saponine uit den bast van *Trevesia sundaica* ¹⁾ is in conc. 1 : 200 niet haemolytisch.

Door verwarming met barytwater verliezen giftige saponinen hun giftigheid en haemolytisch vermogen. Het zelfde geldt voor saponinen, uit hun acetylverbindingen geregeneerd. Men heeft geen verschil in chemische samenstelling kunnen ontdekken tusschen de oorspronkelijke saponinen en de aldus veranderde stoffen.

Van vele saponinen is de elementaire samenstelling bepaald. Tusschen de verschillende samenstellingen bestaat een zeker verband. Door FLÜCKIGER ²⁾ en later door KOBERT ³⁾ zijn homologe reeksen opgesteld. Die van FLÜCKIGER wordt uitgedrukt door de formule $C_n H_{2n-10} O_{18}$, die van KOBERT door $C_n H_{2n-8} O_{10}$. Vooral onder de laatste reeks zijn vele verhoudingsformules van saponinen ondergebracht, soms onder aanname, dat de geanalyseerde stoffen nog water bevatten. De luchtdroge saponinen houden altijd water gebonden. Het grootste deel hiervan kan door drogen gemakkelijk worden uitgedreven, de laatste resten echter heel moeilijk.

In aanmerking dient echter genomen te worden, dat van de meeste saponinen de zuiverheid geenszins vaststaat. Ook is deze homologie in de splitsingsproducten niet terug gevonden.

Te oordeelen naar moleculairgewichtbepalingen is het moleculairgewicht van deze stoffen dikwijls veel grooter, dan bovengenoemde verhoudingsformules aangeven.

¹⁾ BOORSMA. Mededeelingen uit 's Lands plantentuin No. 52. (1902) p. 77.

²⁾ Arch. der Pharm. Bd. 210 (1877) p. 532.

³⁾ Arb. Dorpat. Pharm. Inst. Bd. 6 (1891) p. 29.

Door verwarmen met zuren worden de saponinen gesplitst in sapogenine en suiker.

Tusschenproducten bij de splitsing zijn dikwijls opgemerkt.¹⁾ Een deel van de suiker wordt door zuur gemakkelijk afgesplitst. Daarnaast ontstaat dan een in water onoplosbare stof, die bij verhitten met zuur nog suiker kan afgeven.

Naast sapogenine en suiker komt dikwijls een nog weinig onderzocht ander splitsingsproduct voor. Door HILGER en MERKENS²⁾ is bij de splitsing van het saponineachtige alkaloïde solanine als derde splitsingsproduct crotonaldehyde gevonden.

Van den bouw van de sapogeninen is weinig bekend. 't Meest is wel onderzocht de digitogenine, door splitsing van digitonine verkregen.⁷⁾

Onder de suikers komen zoowel hexosen als pentosen³⁾ en methylpentosen⁴⁾ voor; in vele gevallen komen alle drie soorten suikers in de zelfde saponine voor.

De methylpentosen zijn nog niet nader bestudeerd; als pentose is in een paar gevallen^{3) 5)} arabinose gevonden; van de hexosen zijn glucose⁵⁾ en galactose^{6) 7)} aangetroffen.

¹⁾ Bijv. ROCHLEDER en V. PAYR. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 85 (1862) p. 284; BOORSMA. Meded. uit 's Lands plantent. No. 52 (1902) p. 69 en 93.

²⁾ BER. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 36 (1903) p. 3204.

³⁾ PLZAK. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 36 (1903) p. 1761.

ROSENTHALER. Arch. der Pharm. Bd. 243 (1905) p. 247.

⁴⁾ VOTOCEK en VONDRACEK. v. Lipmann, Chemie der Zuckerarten, 3te Aufl. I p. 190.

ROSENTHALER. Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. 48 (1909) p. 171.

⁵⁾ V. D. HAAR. Pharmac. weekbl. dl. 45 (1908) p. 1184.

⁶⁾ HOFFMANN. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 36 (1903) p. 2722.

⁷⁾ KILIANI. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 24 (1891) p. 339.

Volgens KILIANI bestaat de suiker van digitonine uit glucose en galactose.

DE SAPONINE UIT DE BLADEREN VAN TREVESIA SUNDAICA MIQ.

Voor het volgende onderzoek zijn gebruikt bladeren van *Trevesia sundaica* MIQ ¹⁾, uit Buitenzorg toegezonden door Dr. W. G. BOORSMA en mij voor onderzoek afgestaan door Professor Dr. H. WEFERS BETTINK, waarvoor ik aan beiden mijn dank betuig.

De verse bladeren van *Trevesia sundaica* bevatten volgens GORTER chlorogeenzuur ²⁾. In de door mij onderzochte, gedroogde, oude bladeren kon ik de door GORTER aangegeven reactie niet verkrijgen. Ook bij een versch gedroogd monster, dat voor het verzenden uit Indië een zwakke reactie gaf, verkreeg ik dadelijk na de ontvangst geen duidelijke reactie.

Met betrekking tot de saponine uit deze *blaaeren* is nog geen onderzoek gepubliceerd.

In de mededeelingen uit 's Lands Plantentuin N^o. 52 (1902) p. 77 deelt BOORSMA een voorloopig onderzoek mede over de saponine uit den *bast*:

«Uit 25 gram bastpoeder werd $\pm$ 80 mgr. saponine bereid (volgens de methylalcoholmethode). Het gaf een zeer fraaie purperkleur met zwavelzuur. De geconcentreerde waterige oplossing leverde met normaal loodacetaat een neerslag, waarop in 't filtraat door basisch loodacetaat geen troebeling ontstond. De bast bevat derhalve slechts één saponineachtig bestanddeel.

De oplossende invloed op bloedlichaampjes is gelijk nul

¹⁾ MIQUEL. Flora van Indië, 1^{ste} deel, p. 747.

²⁾ Annales du Jard. Botanique de Buitenzorg, vol. 23 (1909) p. 78.

of uiterst gering, bij een concentratie 1:200 niet waarneembaar.»

AFSCHEIDING DER RUWE SAPONINE.

De afscheiding hiervan werd eerst beproefd volgens de *methyllalcoholmethode*. 100 Gram der tot grof poeder gebrachte, bij c. 40° gedroogde bladeren werd twee dagen met methyllalcohol gepercoleerd.

Van de afgeloopen vloeistof werd de methyllalcohol afgedistilleerd tot op c. 20 c.c. Deze rest werd met 200 c.c. aether geschud. Hierbij werd een bruingele, dikvloeibare laag afgescheiden.

Na bezinking werd de bovenstaande, door chlorophyl groengekleurde, aether afgeschonken.

De dikvloeibare laag werd in methyllalcohol opgenomen en weer met het tienvoudige volume aether gepraecipiteerd.

Na afgieten van den aether werd deze laag opgelost in chloroformwater. De oplossing werd in een dierlijke blaas ongeveer zes weken gedialyseerd. Het chloroformwater buiten de blaas werd om de twee dagen ververscht.

Nu en dan werd van de exarysaten een deel tot droog uitgedampt. De eerste exarysaten lieten hierbij bruine, zeer hygroscopische resten achter, die FEHLINGS proefvocht sterk reduceerden. Bij de laatste exarysaten werden de droogresten aan de lucht nauwelijks meer vochtig. Bij toevoeging van overmaat van FEHLINGS proefvocht aan de geconcentreerde waterige oplossingen der laatste droogresten, ontstonden praecipitaten. Werden deze afgefiltreerd, dan gaven de filtraten bij koken slechts geringe afscheiding van koperoxydule.

Deze droogresten bevatten nog wel glycoside. Werden de oplossingen in water met verdund zuur gekookt, dan scheidden zich vlokkege praecipitaten af. De alkalisch gemaakte filtraten gaven, gekookt met FEHLINGS proefvocht, sterke reductie.

Na de dialyse werd de inhoud van de blaas gefiltreerd en op een waterbad van c. 50° tot droog uitgedampt. De verdampingsrest, die de saponine moet bevatten, werd opgenomen in methylalcohol. Hierbij bleef een weinig, zwarte stof onopgelost, die werd afgefiltreerd. Uit de oplossing werd weer met het tienvoudige volume aether een neerslag verkregen. Nadat de zwak groen gekleurde aether was afgegoten, werd het praecipitaat op een waterbad van c. 50° van aether en methylalcohol bevrijd.

Aldus werd c. 3 gram bruingekleurde ruwe saponine verkregen.

Door behandeling met magnesiumoxyde kon hieruit een minder gekleurd product verkregen worden. Daartoe werd de ruwe saponine opgelost in methylalcohol. Deze oplossing werd met magnesiumoxyde tot droog uitgedampt. De gele gedroogde massa, tot poeder gebracht, werd een uur met methylalcohol uitgekookt. Uit het gefiltreerde uitkooksel werd door destilleeren en uitdampen de methylalcohol verwijderd. Er bleef een zwak geel gekleurde, aan de lucht niet vochtig wordende rest, die in water zwak troebel oploste. Door de behandeling met magnesiumoxyde nog eens te herhalen, werd de kleur slechts weinig lichter.

Het reeds eenmaal uitgekookte gele magnesiumoxyde werd nogmaals een uur met methylalcohol uitgekookt. De verdampingsrest van dit uitkooksel was zeer geel, vervloede aan de lucht en loste slechts gedeeltelijk in water op. Daar de ruwe saponine aan de lucht niet vochtig werd, bleek hier ontleding te hebben plaats gehad.

De stof, bij de eerste uitkoking met methylalcohol uitgetrokken, had een glycosideachtige natuur. Met FEHLINGS-proefvocht in overmaat ontstond een blauw neerslag. In 't filtraat vond bij koken slechts geringe reductie plaats. Werde de stof eenigen tijd met zuur gekookt, dan ontstond daardoor een overvloedig neerslag; het alkalisch gemaakte filtraat reduceerde FEHLINGS proefvocht krachtig. De verdunde oplossing in water schuimde sterk bij schudden.

Deze stof en andere glycosideachtige stoffen, waarvan de verdunde oplossingen in water bij schudden sterk schuimen, worden in 't vervolg met den naam van saponinen of saponinestoffen bestempeld. Van de eigenschappen van de lichtgele saponine, door de eerste uitkoking verkregen, wil ik, om later niet in herhaling te vervallen, slechts die noemen, die invloed hebben gehad op den gang van het volgend onderzoek.

In spiritus van 95 % was ze goed oplosbaar (ook de ruwe saponine loste er, op een weinig bruine stof na, in op).

Werd de oplossing in water met ammoniumsulfaat verzadigd, dan werd de saponine uitgezouten. Zelfs bij een oplossing 1 : 6000 ontstond nog een vlokkig praecipitaat.

Werd een oplossing 1 : 100 met ammoniumsulfaat verzadigd en het praecipitaat afgefiltreerd, dan gaf het filtraat, met het dubbele volume zoutzuur van 12,5 % gekookt, geen troebeling.

Dat kleine hoeveelheden saponine ook bij aanwezigheid van veel ammoniumsulfaat nog door koken met zoutzuur konden worden aangetoond, bleek uit de volgende proef. Een oplossing van de saponine 1 : 2000, verzadigd met ammoniumsulfaat, gaf een vlokkige afscheiding. Na toevoeging van twee volumes zoutzuur van 12,5 % werd de oplossing weer helder. Werd deze gekookt, dan ontstond een vlokkig praecipitaat, dat bij afkoeling niet weer oploste.

Bij de afscheiding van *een grootere hoeveelheid* saponine werd in plaats van met methylalcohol, met aethylalcohol van 95 % uitgetrokken.

In plaats van gedialyseerd werd uitgezouten. Hierdoor werd even goed als door dialyseeren de saponine van de suikerachtige, hygroskopische stoffen gescheiden, terwijl de bewerking veel vlugger afliep.

2 Kilogram van de bij 40° gedroogde, tot grof poeder gebrachte bladeren werd *gepercoleerd* met spiritus van 95%.

Telkens, wanneer een voldoende hoeveelheid vloeistof was

afgeloopen, werd hiervan de spiritus onder lage druk grootendeels afgedestilleerd.

De resten van de eerst afgeloopen vloeistoffen konden gemakkelijk in wat spiritus van 95 % worden opgenomen. Uit de aldus verkregen oplossingen werd de saponine met aether neergeslagen, zooals bij de methylalcoholmethode is beschreven.

De latere, zwak groene percolaten lieten resten achter, die niet in sterken spiritus of methylalcohol konden worden opgenomen. Ze werden met behulp van spiritus van c. 45 %, die saponine en suiker oploste, en van aether, die chlorophyl en wasachtige stoffen opnam, in een flesch overgebracht en daarin met aether geschud. Na bezinking werd de aetherische laag van de geelbruine waterige laag, die de saponine bevatte, gescheiden.

Ook uit deze aetherische laag kon nog wat saponine gewonnen worden. Aether en alcohol werden door destilleeren en verdampen verwijderd. De rest werd opgenomen in wat sterken spiritus. Deze oplossing werd met het tienvoudige volume aether geschud, waardoor een dikvloeibaar, bruingeel neerslag ontstond. Dit werd bij de vroeger verkregen, saponine bevattende producten gevoegd.

De percolatie met spiritus werd een week voortgezet. De aflopende vloeistof was toen nog groen getint en liet bij verdamping een niet onbelangrijke rest achter, die nog saponine bevatte: de verdunde oplossing in water schuimde sterk bij schudden; werd de oplossing in water met zuur gekookt, dan ontstond een vlokkig neerslag.

Om meer volledige uittrekking te verkrijgen, werd het uitgetrokken plantenpoeder een uur met sterken spiritus *uitgekookt*; na bekoeling werd uitgeperst. De aldus verkregen vloeistof werd behandeld, als de laatste percolaten. Het uitkoken werd nog twee maal herhaald. De stof, bij de laatste uitkoking verkregen, bevatte nog wat saponine.

De saponine bevattende producten, op de boven beschreven wijze verkregen, werden bijeengevoegd. Dit mengsel werd

op een waterbad van c. 50° eenigszins uitgedampt ter verwijdering van het grootste deel van spiritus en aether. Vervolgens werd het opgenomen in water tot 2 liter. In deze oplossing werd onder zachte verwarming 1,4 kilogram ammoniumsulfaat bij gedeelten opgelost. Er ontstond een bruin, vlokkig, spoedig samenklappend neerslag. De vloeistof werd afgeschonken en gefiltreerd.

Een proefje van het bruingele filtraat, gekookt met het dubbele volume zoutzuur van 12,5 %, gaf slechts een geringe, bruine, niet vlokkige troebeling.

De neergeslagen saponine werd weer in water opgelost en met ammoniumsulfaat uitgezouten. Het aldus verkregen praecipitaat was bij gewone temperatuur hard en broos. Nadat het met filtreerpapier was afgedroogd, werd het tot poeder gebracht. Door uitkoken met spiritus van 95 % werd de saponine hieraan onttrokken. De oplossing was bruingeel gekleurd. Er bleef een donkerbruine massa onopgelost. Deze werd fijn gewreven en nog eens met spiritus van 95 % uitgekookt, waardoor nog wat in oplossing ging.

Van de oplossing werd een deel van de spiritus afgedestilleerd. De rest werd op een waterbad van c. 50° op een vlakke schaal tot droog uitgedampt. De aldus verkregen bruine massa, de ruwe saponine, werd tot poeder gebracht. Ze werd aan de lucht niet vochtig.

Daar door uitkoken met spiritus nog niet alle saponine aan het plantenpoeder was onttrokken, werd dit nog een uur met water uitgekookt. De door uitpersen verkregen vloeistof werd bij lage temperatuur gedeeltelijk uitgedampt, waardoor ze zeer donker werd.

Door uitzouten met ammoniumsulfaat werd hieruit een bruinzwarte massa afgescheiden, die door herhaald oplossen in water en uitzouten met ammoniumsulfaat werd gereinigd.

Uit dit praecipitaat werd door uitkoken met spiritus van 95 % nog wat ruwe saponine gewonnen. Een groot deel van het praecipitaat loste echter niet op.

Te zamen verkreeg ik c. 100 gram ruwe saponine (5 % van de gedroogde bladeren).

Bij de afscheiding van de ruwe saponine was ammoniumsulfaat gebruikt. Later bleek mij, dat ammoniumsulfaatoplossingen bij uitdamping zuur gaan reageeren.

Na uitdamping van spiritueuze oplossingen, die wat ammoniumsulfaat bevatten, zal in de droogresten dus een weinig vrij zwavelzuur aanwezig zijn.

Daarom heb ik later, wanneer ik saponinestoffen uit hun oplossing wou neerslaan, uitgezouten door verzadiging met chloorvrij magnesiumsulfaat (80 deelen op 100 deelen vloeistof).

De afscheiding met magnesiumsulfaat was even volkomen, als die met ammoniumsulfaat, terwijl er geen zuur in het praecipitaat werd gebracht.

ONDERZOEK VAN DE RUWE SAPONINE.

De ruwe saponine loste in water helder op tot een zwak zuur reageerende vloeistof.

In absoluten alcohol loste ze bij verwarming, op een weinig bruine stof na, op. Een oplossing 1 : 10 zette bij bekoeling een donker gekleurde stof af. In spiritus van 90 % was de saponine gemakkelijk oplosbaar.

Aceton onttrok er bij koken een groenachtige saponineachtige stof aan, moeilijk in aceton, gemakkelijk in water oplosbaar.

Aether en chloroform namen bij koken slechts weinig op van een in water onoplosbare stof.

Aether praecipiteerde uit een spiritueuze oplossing de saponine. De spiritueus-aetherische oplossing liet bij verdamping een weinig witte stof achter, onoplosbaar in water. Chloroform praecipiteerde uit spiritueuze oplossingen de saponine niet zoo gemakkelijk als aether.

In een oplossing in water gaf loodacetaat een niet zeer overvloedig bruin neerslag, dat in overmaat van loodacetaat niet oploste. Dit werd afgefiltreerd en uitgewasschen, eerst

met een verdunde oplossing van loodacetaat, daarna met alcohol. Daarna werd het neerslag in water verdeeld en met zwavelwaterstof ontleed. Het loodsulfide werd afgefiltreerd en herhaaldelijk met alcohol uitgekookt, waardoor een bruine stof in oplossing ging. De filtraten werden tot droog uitgedampt. Van de droogrest was maar zeer weinig in water oplosbaar. Deze oplossing schuimde nauwelijks bij schudden. In ammonia loste de stof op tot een donkerbruine vloeistof. Daar het mij voorkwam, dat deze stof weinig of geen saponine bevatte, werd ze niet verder onderzocht.

Bij het onderzoek van de verhouding van de saponine tegenover basische loodacetaten werden twee verschillend basische oplossingen gebruikt, n.l. een oplossing, bereid uit 30 deelen loodacetaat, 10 deelen loodglid en 100 deelen water (loodazijn = c. half-basisch loodacetaat), en een oplossing, bereid uit 37,85 deelen loodacetaat, 22,25 deelen loodglid en water tot 250 volumedeelen (één-basisch loodacetaat).

De van het praecipitaat, met loodacetaat verkregen, afgefiltreerde vloeistof gaf met loodazijn bij gewone temperatuur geen praecipitaat, wel bij verwarming tot kooktemperatuur. In overmaat van het praecipiteermiddel loste dit praecipitaat niet zichtbaar op.

Na affiltreeren van dit zeer gele neerslag werd een geel filtraat verkregen, waaruit door ammonia weer een geel praecipitaat werd afgescheiden.

Werd dit afgefiltreerd, dan werd een nagenoeg kleurloos filtraat verkregen. Dit bevatte geen saponine meer: Na toevoegen van een overmaat van verdund zwavelzuur en affiltreeren van het gevormde loodsulfaat, werd het filtraat bij koken niet troebel.

Werd het praecipitaat, verkregen met loodazijn, en dat, uit het filtraat met ammonia verkregen, met overmaat van verdund zwavelzuur ontleed en het loodsulfaat afgefiltreerd, dan gaven de filtraten bij koken sterke, vlokke afscheidingen (door splitsing van de saponine).

Bij de hierboven besproken behandeling met loodazijn was loodazijn toegevoegd aan een oplossing, waarin reeds loodacetaat aanwezig was. Hierdoor was een oplossing verkregen, die in verhouding tot loodacetaat minder lood-oxyde bevatte, dan bij loodazijn het geval is.

Werd een oplossing van de ruwe saponine, zonder voorafgaande behandeling met neutraal loodacetaat, verwarmd met loodazijn, dan was de praecipitatie meer volledig. Er ontstond een overvloedig, geel praecipitaat. Het filtraat was slechts zwak gekleurd; met overmaat van loodazijn verwarmd, gaf het geen praecipitaat meer; met ammonia echter een overvloedig, tamelijk wit praecipitaat.

Werd een oplossing van de ruwe saponine met één-basisch loodacetaat verwarmd, dan ontstond een overvloedig praecipitaat. Het filtraat gaf met ammonia slechts een gering neerslag.

Er blijkt dus, dat er meer wordt gepraecipiteerd, naarmate het basisch loodacetaat sterker basisch is, tot tenslotte basisch loodacetaat + ammonia alles neerslaat.

De ruwe saponine ontleedt bloedlichaampjes in een mengsel van bloed en chloornatriumoplossing van 0,8%.

Het gebruikte mengsel werd verkregen door één gram runderbloed met de chloornatriumoplossing tot 100 c.c. te verdunnen. Werd in dit mengsel saponine opgelost 1 : 500, dan werd het in 3 minuten helder; met saponine 1 : 1000 in 10 minuten.

Zooals reeds bij de bespreking van de methylicalcohol-methode is vermeld, kan uit de ruwe saponine door behandeling met magnesiumoxyde een zwak geel gekleurd product verkregen worden (blz. 12). Het grootste bezwaar tegen deze methode is, dat er ontleding bij plaats vindt.

Door de volgende wijziging kan de verwijdering van gekleurde stoffen ook bij gewone temperatuur plaats vinden, waardoor de kans op ontleding vermindert.

Magnesiumoxyde zwelt, met veel water vermengd, op tot een pap van een hydraat. Het magnesiumoxydehydraat

werd afgezogen, daarna afgewreven met alcohol en opnieuw afgezogen. Door deze bewerking eenige malen te herhalen, werd het magnesiumoxydehydraat grootendeels van water bevrijd.

Een proefje van de ruwe saponine, opgelost in absoluten alcohol, werd een paar minuten met een voldoende hoeveelheid van dit, nog door alcohol vochtige, hydraat geschud. Dit verdeelde zich hierbij in de vloeistof tot een pap, die het grootste deel van de gekleurde stoffen bond. Het hydraat werd afgezogen. Het filtraat liet na uitdamping een lichtgele rest achter, in water met zwakke opalescentie oplossend. De opbrengst was ongeveer de helft van het gewicht van de ruwe saponine.

Ook werd beproefd, met andere hydraten van metaaloxiden ontkleuring te verkrijgen. Werden oplossingen der ruwe saponine in alcohol met versch gepraecipiteerde hydraten van loodoxyde, zinkoxyde of aluminiumoxyde geschud, dan werden ze ook gedeeltelijk ontkleurd, maar veel langzamer en minder volkomen, dan bij gebruik van magnesiumoxydehydraat.

Werden de alcoholische saponineoplossingen met de genoemde hydraten gekookt en het hydraat dikwijls ververscht, dan werden de gekleurde stoffen wel wat beter verwijderd (het minst bij zinkoxydehydraat).

Aan oplossingen in water ontrok loodoxydehydraat niet alleen de gekleurde stoffen, maar ook nagenoeg al de saponine. Aluminiumoxydehydraat ontkleurde de waterige oplossing nog al goed; uit het filtraat werd ongeveer de helft van de saponine teruggewonnen. Zinkoxydehydraat ontkleurde ook de oplossing in water slechts weinig.

De saponinestoffen, uit de ruwe saponine door behandeling met magnesiumoxyde, magnesiumoxydehydraat of andere hydraten van metaaloxiden verkregen, onderscheidden zich van de ruwe saponine onder anderen daardoor, dat ze veel minder bloedontledend (haemolytisch) waren.

De, in alcoholische oplossing met loodoxydehydraat gekookte,

saponine had slechts één vijfde van het haemolytisch vermogen van de ruwe saponine. Ongeveer even sterk haemolytisch was de saponine, uit de ruwe verkregen door behandeling van de waterige oplossing met aluminiumoxydehydraat. De, door magnesiumoxyde en het hydraat hiervan ontkleurde, saponinen waren nagenoeg niet haemolytisch.

De verdunde waterige oplossingen schuimden bij schudden nog tamelijk sterk.

BEHANDELING VAN DE RUWE SAPONINE MET MAGNESIUMOXYDEHYDRAAT.

De in 't voorgaande besproken eigenschappen van de ruwe saponine geven twee methoden aan de hand, om daaruit een deel van de saponine af te scheiden, grootendeels van de kleurstoffen bevrijd:

1^{ste} de loodmethode; men kan de oplossing der saponine in water praecipiteeren met een basisch loodacetaat met een zoodanige basiciteit, dat juist de (zure) gekleurde stoffen volkomen worden gepraecipiteerd; uit het filtraat kan dan een weinig gekleurde fractie verkregen worden;

2^{de} de magnesiumoxydehydraatmethode. Deze laatste, die mij eenvoudiger en veiliger voorkwam, werd door mij verkozen.

Bij gedeelten werd c. 70 gram saponine gebruikt. Ze werd daartoe opgelost in spiritus van 90%. Deze oplossing werd met magnesiumoxydehydraat geschud. Daarna werd het zeer gele hydraat door afzuigen van de lichtgele vloeistof gescheiden. De uitschudding werd met versch magnesiumoxydehydraat herhaald, waardoor de kleur van het filtraat nog wat lichter werd. Dit liet bij verdamping een *lichtgele saponine* (1) achter.

Om de stoffen terug te verkrijgen, die door het magnesiumoxydehydraat waren gebonden, werd dit met verdund zwavelzuur opgelost. De toevoeging van het zwavelzuur geschiedde langzaam en onder afkoeling; zorg werd gedragen, dat de vloeistof zwak alkalisch bleef.

Om uit deze oplossing de saponine af te scheiden, werd ze met magnesiumsulfaat verzadigd. Hierdoor ontstond een bruin neerslag (2), dat werd afgefiltreerd.

Het filtraat was donkerbruin. Eerst werd nagegaan, of dit filtraat nog saponine bevatte. Een gedeelte werd met verdund zwavelzuur zwak zuur gemaakt; hierdoor werd een bruine stof (3) afgescheiden, die werd afgefiltreerd. Het filtraat was lichtbruin en gaf bij koken met het dubbele volume zoutzuur van 12,5 % geen troebeling, bevatte dus geen saponine. De bruine stof (3), door verdund zwavelzuur afgescheiden, werd eenige malen met een verzadigde oplossing van magnesiumsulfaat nagewasschen ter verwijdering van het zuur. Daarna werd uitgekookt met alcohol, waarin de bruine stof nagenoeg geheel oploste. Na verdamping van deze oplossing bleef een bruine rest, die in water zwak troebel oploste tot een vloeistof, die bij schudden nauwelijks schuimde. Bij koken met zwavelzuur ontstond langzamerhand een bruine, niet vlokkige troebeling. Ook deze bruine stof (3) bevat dus geen saponine.

Al de saponine, door oplossen van het magnesiumoxydehydraat in verdund zwavelzuur vrij gekomen, was dus door het magnesiumsulfaat neergeslagen. Het bruine neerslag (2), dat deze saponine moet bevatten, werd met alcohol uitgekookt. Hierbij bleven magnesiumsulfaat en bruine stoffen terug; het uitkooksel was groen. De onopgeloste stoffen werden fijn gewreven en nog eens met alcohol uitgekookt. Dit uitkooksel werd bij het eerste gevoegd.

Deze groene alcoholische oplossing werd weer twee maal met magnesiumoxydehydraat geschud. Hierdoor werd ze lichtgeel. De lichtgele verdampingsrest werd gevoegd bij de lichtgele saponine (1), reeds vroeger verkregen.

Uit het magnesiumoxydehydraat werd op de bovenbeschreven wijze weer een *groenachtige saponine* afgescheiden.

In 't geheel verkreeg ik ongeveer 40 gram gele en 10 gram groene saponine.

De groene en de gele saponine verschillen van elkaar in de volgende eigenschappen.

De groene saponine ontleedt gemakkelijk bloedlichaampjes in een bloedmengsel. Het bloedmengsel 1 : 100 werd met groene saponine 1 : 6000 in 16 minuten helder.

De gele saponine was nauwlijks haemolytisch.

Met neutraal loodacetaat ontstond in de oplossing van de groene saponine een zwakke troebeling; die van de gele bleef helder.

Met loodazijn in overmaat tot koken verwarmd, gaf de groene saponine een sterk, de gele slechts een gering praecipitaat.

ONDERZOEK VAN DE GELE SAPONINE.

Deze was uit de ruwe saponine verkregen, door verwijdering van de bruine stoffen en de «groene saponine» door middel van magnesiumoxydehydraat. Door herhaalde behandeling met metaaloxiden of metaaloxydehydraten kon de gele kleur niet verwijderd worden.

De gele saponine loste bij verwarming (bijv. bij 60°) gemakkelijk op in absoluten alcohol. Bij afkoeling werd uit een geconcentreerde oplossing een deel der saponine weer afgezet, minder geel gekleurd, dan de oorspronkelijke saponine, terwijl de oplossing groenachtig geel bleef.

Indien aan een spiritueuze oplossing van de saponine zooveel aether werd toegevoegd, dat een deel der saponine neersloeg, dan was de neergeslagen saponine ook minder geel gekleurd, dan die, door uitdamping uit de spiritueus-aetherische oplossing verkregen.

Hiervan werd gebruik gemaakt, om de saponine van de geel gekleurde stof te bevrijden.

Daartoe werd 40 gram gele saponine onder verwarming opgelost in 200 c.c. spiritus van 95 %.

Na bekoeling, waarbij een deel der saponine reeds werd afgescheiden, werd onder omschudden langzamerhand een

mengsel van 50 c.c. spiritus en 50 c.c. aether toegevoegd, daarna nog 200 c.c. aether. (Door eerst een mengsel van alcohol en aether toe te voegen, krijgt men meer geleidelijke afscheiding van de saponine, dan wanneer men dadelijk aether toevoegt).

Van de gepraecipiteerde saponine, die goed samenpakte, werd de groenachtig gele bovenstaande vloeistof afgegoten. De saponine werd weer opgelost in 125 c.c. spiritus en met 125 c.c. aether gepraecipiteerd. Oplossing en praecipitatie met deze laatste hoeveelheden vloeistof werden tot 10 maal herhaald. De laatste spiritueus-aetherische oplossingen waren nauwelijks getint. De afgescheiden saponine (1) was toen niet meer geel, maar een weinig bruin getint.

De spiritueus-aetherische oplossingen, bij deze praecipitaties verkregen, bevatten nog veel saponine. Een gedeelte hiervan kon gewonnen worden, nagenoeg vrij van de gele stof, door aether en spiritus af te destilleeren en de rest uit 35 c.c. spiritus met 35 c.c. aether zoo vaak te praecipiteeren, dat de gele kleur was weggenomen. De aldus verkregen saponine (2) werd bij de vroeger verkregen saponine (1) gevoegd. Samen vormen ze *fractie 1*.

Op deze wijze kon ik uit de resten van de, telkens verkregen, spiritueus-aetherische oplossingen nieuwe fracties verkrijgen, hetzij door minder oplosmiddelen te gebruiken, hetzij door in verhouding tot den alcohol meer aether te gebruiken, dan bij de voorafgaande reeks praecipitaties.

Aldus werden nog drie fracties gewonnen: de eerste door herhaalde praecipitatie uit 35 c.c. spiritus met 70 c.c. aether, de tweede door praecipitatie uit 15 c.c. spiritus met 30 c.c. aether — deze twee fracties samengevoegd vormen *fractie 2* —, de derde door praecipitatie uit 15 c.c. spiritus met 100 c.c. aether — *fractie 3*.

(Over het onderzoek van de spiritueus-aetherische oplossing, na afscheiding van fractie 3 verkregen, zie blz. 26).

De fracties 1, 2 en 3 waren nog bruinachtig gekleurd. Ze werden opgelost in spiritus van 95%; de oplossingen

werden geschud met magnesiumoxydehydraat. Hierdoor werd een klein gedeelte van de saponine en nagenoeg alle bruingekleurde stof verwijderd. De door uitdamping verkregen saponinen waren nog een spoor geel getint.

Door koken van de oplossingen in absoluten alcohol met dierlijke kool, werden de laatste resten van gekleurde stoffen zoo goed als geheel verwijderd. Uit de gefiltreerde alcoholische oplossingen werden de saponinen door afdestilleeren en verdampen van het oplosmiddel terug gewonnen.

Daar het mij waarschijnlijk voorkwam, dat na al deze bewerkingen de afgescheiden saponinen wel *splitsingsproducten* (bijv. suiker en sapogenine) zouden bevatten, werden ze eerst eenige malen uit een oplossing in water met magnesiumsulfaat uitgezouten ter verwijdering van de suiker.

Om de gepraecipiteerde saponinen van magnesiumsulfaat te bevrijden, werden ze uitgetrokken met alcohol; hierbij bleef het grootste deel van het magnesiumsulfaat achter, 't welk nog wat saponine ingesloten hield. De saponine werd er uit verkregen, door het magnesiumsulfaat in weinig water op te lossen en het daarna met veel alcohol te praecipiteeren.

De gefiltreerde spiritueuze oplossingen werden samen op een waterbad van c. 50° uitgedampt tot droog. De gedroogde saponinen werden tot poeder gebracht en onder verwarming opgelost in mengsels van gelijke volumes absoluten alcohol en chloroform; deze oplossingen werden warm gefiltreerd. Hierbij bleef nagenoeg alle magnesiumsulfaat onopgelost achter.

Om het andere vermoedelijke splitsingsproduct te verwijderen (sapogenine?), werden de saponinen met groote hoeveelheden aether gepraecipiteerd. De afgescheiden praecipitaten werden in spiritus opgelost en weer met aether gepraecipiteerd. Oplossing en praecipitatie werden een paar maal herhaald.

De kleine resten, na afdestilleeren van het oplosmiddel uit de spiritueus-aethesische oplossingen verkregen, waren niet geheel in water oplosbaar.

De praecipitaten werden ten slotte, door voorzichtig uitdampen en drogen, van alcohol en aether bevrijd.

De fracties 1 en 2 waren wit, fractie 3 nog een weinig getint. De opbrengst van fractie 1 was c. 18 grm., die van fractie 2 (waarvan een deel was verloren gegaan) c. 2,5 grm., die van fractie 3 c. 3 gram.

Om te onderzoeken, of de fracties nog magnesiumsulfaat of andere minerale bestanddeelen bevatten, werd van elk 200 mgr. verbrand. Hierbij bleef slechts een spoor asch achter (minder dan 0,25 %).

Oplossingen van 5 % der fracties in water gaven met bariumnitraat geen praecipitaat. Toevoeging van 0,01 % magnesiumsulfaat aan de oplossingen deed een duidelijke troebeling ontstaan. Zwavelzuur — dus ook magnesiumsulfaat — was in de saponinen dus niet meer van beteekenis aanwezig.

De fracties 1, 2 en 3 waren met magnesiumsulfaat uitgezouten. 't Is wel waarschijnlijk, dat na de praecipitatie alle vrije suiker was weggenomen. Maar daarna hadden de saponinen nieuwe bewerkingen ondergaan (praecipitatie uit alcohol met aether; uitdrogen van de praecipitaten), zoodat het mogelijk was, dat weer ontleding had plaats gehad en dus suiker was vrijgekomen. Daarom werd bij de fracties op vrije suiker gereageerd.

Bij 5 % oplossingen van de fracties in water werd FEHLINGS proefvocht gevoegd. Hierdoor ontstonden sterke, geleachtige praecipitaten, die werden afgefiltreerd. In de filtraten ontstond bij koken zwakke reductie.

Ter vergelijking werd een oplossing, bevattende 5 % van fractie 1 en 0,025 % glucose (dus 1 glucose op 200 saponine), op dezelfde wijze behandeld. Hierbij ontstond belangrijk sterkere reductie.

De reductie, veroorzaakt door de fracties, behoeft nog niet aan een verontreiniging met suiker te worden toegeschreven. De saponine wordt niet volledig door het proef-

vocht neergeslagen. De reductie zou dus veroorzaakt kunnen worden, of doordat de saponine zelf reduceerde, of doordat bij de behandeling met het sterk alkalische proefvocht wat suiker was afgesplitst: Deze saponinen kunnen, zooals later wordt besproken, gemakkelijk met alkali worden gesplitst.

Dat saponine, zeer waarschijnlijk vrij van suiker, toch reductie gaf, werd op de volgende wijze aangetoond. 200 Mgr. van fractie 1 werd in water opgelost en gepraecipiteerd met magnesiumsulfaat. Het praecipitaat werd afgezogen, weer opgelost in water, nog eens met magnesiumsulfaat uitgezouten en daarna weer afgezogen. Vervolgens werd het door afdrukken tusschen filtreerpapier zooveel mogelijk van de aanhangende vloeistof bevrijd.

Het praecipitaat werd nu opgelost in water; na toevoeging van FEHLINGS proefvocht werd het neerslag, daardoor ontstaan, afgefiltreerd. Werde het verkregen filtraat gekookt, dan scheidde zich een gering, geleachtig neerslag af. Dit belette echter niet, dat waargenomen kon worden, dat er zwakke reductie had plaats gehad.

Na het herhaalde uitzouten met magnesiumsulfaat, waarbij zeer waarschijnlijk alle suiker was verwijderd, had hier de saponine geen bewerking meer ondergaan, die ontleding kon veroorzaken. Toch vond reductie plaats.

De zwakke reductie, bij de fracties verkregen, moet dus zeer waarschijnlijk niet, of slechts voor een gedeelte, aan een verontreiniging met suiker worden toegeschreven.

Bij fractie 1 werd nog de volgende proef genomen: Een oplossing in water van c. 5 % werd met magnesiumsulfaat uitgezouten. De afgefiltreerde oplossing van magnesiumsulfaat vertoonde in een 2 d.M. buis geen draaiing.

In het eerste deel van dit hoofdstuk is medegedeeld, hoe uit de gele saponine door praecipiteeren uit spiritus met aether de fracties 1, 2 en 3 waren afgescheiden. De spir. aeth. oplossing (15 vol. spiritus + 100 vol. aether), bij de afscheiding van fractie 3 verkregen, werd als volgt behan-

deld. Ze werd met veel water geschud. Hierdoor ontstonden twee lagen, een *waterige*, die ook alcohol en wat aether bevatte, en een *aetherische*.

De *aetherische laag* werd van de waterige gescheiden en met water uitgeschud (dit werd bij de waterige vloeistof gevoegd). Ze liet na verdamping van de aether een groengele, wasachtige rest achter, die bij verwarming half vloeibaar werd. Deze rest werd niet verder onderzocht.

De *waterige laag* werd nog eens met aether uitgeschud (hierin gingen slechts sporen van een witte stof over). Bij staan scheidde zich uit deze laag een *witte stof* af. Een meer belangrijke afscheiding van witte stof werd verkregen, door de oplossing gedeeltelijk uit te dampen, waardoor de spiritus werd verwijderd. De witte stof werd afgefiltreerd en met water nagewasschen.

Het *filtraat* liet na uitdamping een groengele, hygroscopische, in water oplosbare stof achter, waarvan de oplossing in water bij koken met zuur een overvloedig praecipitaat gaf. Deze groengele stof kon, noch met behulp van magnesiumoxydehydraat, noch met dierlijke kool ontkleurd worden. Na uitzouten met magnesiumsulfaat bleef ze hygroscopisch. Ze werd niet verder onderzocht.

De *witte stof* (die verder als *fractie 4* wordt onderscheiden), uit de waterige laag verkregen, werd gereinigd door ze op te lossen in spiritus en ze weer uit deze aflossing af te scheiden door toevoegen van veel water en gedeeltelijk uitdampen van dit mengsel, waardoor de spiritus werd verwijderd. De witte stof werd afgefiltreerd, met water uitgewasschen en gedroogd.

Ze was in water moeilijk oplosbaar, gemakkelijk oplosbaar in absoluten alcohol, spiritus van 70° en ijsazijn, in chloroform en aether nauwelijks oplosbaar. Uit een oplossing in alcohol werd ze echter moeilijk door aether of chloroform afgescheiden.

Werd een oplossing in ijsazijn met water vermengd, tot een blijvende troebeling ontstond, dan scheidden zich, bij

staan aan de lucht, microscopische, naaldvormige kristallen af, voor het meerendeel tot kogelvormige groepen vereenigd.

Met alkali verwarmd, loste zeer weinig van het poeder op. Werd echter een proefje opgelost in alcohol, daaraan alkali toegevoegd en vervolgens veel water, dan bleef de oplossing helder.

Werd deze oplossing zuur gemaakt, dan scheidde zich een vlokking praecipitaat af.

De witte stof (fractie 4) gaf bij splitsing suiker: Werd een proefje eenigen tijd met zuur gekookt en daarna gefiltreerd, dan gaf het alkalisch gemaakte filtraat, met FEHLINGS proefvocht verwarmd, reductie.

ONDERZOEK VAN DE FRACTIES.

In dit hoofdstuk worden eenige eigenschappen van de fracties behandeld en onderling vergeleken.

De *smeltpunten* van de fracties konden niet bepaald worden, daar deze stoffen bij verhitting werden ontleed. Van de gedroogde fracties 1, 2, 3 en 4 werden kleine hoeveelheden in capillaire buisjes in een zwavelzuurbad verhit. Bij c. 140° begonnen de poeders bruin te worden. Bij stijging van de temperatuur werd de kleur donkerder. Bij c. 200° begonnen de poeders samen te pakken; bij 215 à 220° gingen ze in teerachtige massa's over. Bij nog hooger temperatuur had gasontwikkeling plaats.

Veel verschil was bij de fracties niet waar te nemen.

Oplosbaarheid in water en alcohol. De fracties 1 en 2 losten in water snel en in elke verhouding op.

Fractie 3 loste niet zoo snel op; de geconcentreerde oplossing in koud water scheidde bij verwarming een geleijachtige massa af, die bij bekoeling weer oploste.

In kokenden absoluten alcohol losten de fracties 1, 2 en 3 gemakkelijk op. Uit oplossingen van 1 gewichtsdeel in 10 volumes absoluten alcohol werd, bij bekoeling tot 15° , bij de

fracties 1 en 2 een deel afgescheiden (bij fractie 1 het meest); de oplossing van fractie 3 bleef helder.

Fractie 4 loste in alcohol gemakkelijk op. Een door verwarming verkregen oplossing 1 : 10 bleef bij bekoeling helder. Ook in verdunden spiritus is ze goed oplosbaar: Bij verdunning van de oplossing in alcohol 1 : 10 met een gelijk volume water, bleef deze helder. Met veel water ontstond een vlokkig praecipitaat.

Om de oplosbaarheid van fractie 4 in water te onderzoeken, werd de, met veel water verdunde, alcoholische oplossing grootendeels uitgedampt ter verwijdering van den spiritus. Na toevoeging van water, werd de fijn gepraecipiteerde stof afgefiltreerd en met veel water uitgewasschen. Zoowel de eerste als de latere filtraten lieten bij verdamping kleine resten achter, niet zichtbaar in water oplosbaar. Fractie 4 is dus, ofschoon moeilijk, in water oplosbaar; of ten minste ze bevat een stof, die deze eigenschap bezit.

Ofschoon fractie 4 op zich zelf moeilijk in water oplosbaar was, kon ze met behulp van fractie 1 in oplossing worden gebracht. Werd 1 deel fractie 4 met 4 deelen fractie 1 in alcohol opgelost en deze oplossing uitgedampt, dan bleef er een rest, oplosbaar in water ook bij verwarming.

De mogelijkheid bestond dus, dat fractie 3 slechts een mengsel was van de fracties 1 en 4. In dat geval zou een mengsel van deze fracties, dat zooveel fractie 4 bevatte, dat het nog juist in water oploste, eigenschappen hebben, overeenkomende met die van fractie 3, of eigenlijk nog iets meer afwijkende van die van fractie 1, dan bij fractie 3 het geval was.

Gelijke deelen van de fracties 1 en 4 werden in alcohol opgelost. De verdampingsrest van deze oplossing loste in koud water nagenoeg geheel op. Bij verwarming van de geconcentreerde oplossing werd een korrelig praecipitaat afgescheiden, dat na afkoeling bleef. Dit werd afgefiltreerd; het filtraat gaf bij verwarming wel een geringe troebeling, maar geen geleachtige afscheiding zooals fractie 3.

Het mengsel van gelijke deelen fractie 1 en 4, dat dus veel meer fractie 4 bevat, dan in fractie 3 aanwezig zou kunnen zijn, werd in 10 volumes warmen absoluten alcohol opgelost. Bij bekoeling zette zich weer een groot deel af. (fractie 3, 1:10, is ook bij gewone temperatuur oplosbaar).

Fractie 3 is dus niet (of niet uitsluitend) een mengsel van de fracties 4 en 1.

Verhouding tot een oplossing van magnesiumsulfaat.

Er werd nagegaan hoeveel magnesiumsulfaatoplossing gevoegd moest worden bij even sterke oplossingen van de fracties 1, 2 en 3, om praecipitatie te veroorzaken.

De gebruikte magnesiumsulfaatoplossing bevatte op 50 deelen water 40 deelen $Mg SO_4 + 7 aq.$

De gebruikte saponinen waren eerst een uur bij 100° gedroogd en vervolgens een dag aan de lucht blootgesteld geweest. In elk geval was daarbij 10% water aangetrokken.

De saponineoplossingen werden bereid, door van deze luchtdroge fracties 100 mgr. in 2 c.c. water op te lossen (1:20).

Bij deze oplossingen werd bij kamertemperatuur ($12,5^{\circ}$) onder omschudden zoo lang oplossing van magnesiumsulfaat gedruppeld, tot een geringe blijvende troebeling ontstond.

Hiertoe was noodig:

bij fractie 1, 6,2 c.c. magnesiumsulfaatoplossing.

» » 2, 5,15 c.c. »

» » 3, 1,0 c.c. »

Fractie 3 geeft dus veel gemakkelijker een neerslag, dan fractie 1 en 2.

Om na te gaan, of in een mengsel van de fracties 1 en 3 de ééne fractie invloed op de praecipiteerbaarheid van de andere had, werden nog de volgende proeven genomen:

Een oplossing werd bereid van 10 mgr. fractie 3 op 2 c.c. water. Om hierin een neerslag te verkrijgen, was noodig 2,2 c.c. oplossing van magnesiumsulfaat.

Een tweede oplossing, die bevatte op 2 c.c. water 10 mgr. fractie 3 en 90 mgr. fractie 1, vereischte 4,85 c.c. magnesium-

sulfaatoplossing. Fractie 1 belemmert dus de praecipitatie van fractie 3.

Nu werd bij beide oplossingen zooveel magnesiumsulfaat-oplossing gevoegd, dat de hoeveelheid 6,2 c.c. bedroeg (d. i. de hoeveelheid, noodig, om bij een oplossing van 100 mgr. van fractie 1 in 2 c.c. juist een praecipitaat te verkrijgen).

In beide gevallen ontstond een neerslag. Dat bij de mengproef was het sterkst; dit praecipitaat is dus wel een mengsel van fractie 1 en fractie 3.

Werden de fracties, die met magnesiumsulfaatoplossing tot de grens van praecipitatie waren gebracht, ook slechts weinig verwarmd, dan scheidde zich een deel van de saponine geleijachtig af. Bij bekoeling loste dit weer op.

Zooals reeds is medegedeeld, gaven geconcentreerde oplossingen van fractie 3, ook zonder toevoeging van magnesiumsulfaat, bij verwarming geleijachtige afscheidingen.

Draaiingsvermogen. Het draaiingsvermogen van de fracties 1, 2 en 3 voor D-licht werd bepaald in oplossingen in water in een 2 d.M. buis bij c. 10°.

Van de luchtdroge saponinen werd een afgewogen gedeelte in water tot een bepaald volume opgelost. Een ander deel van de fracties werd bij 105 à 110° tot constant gewicht gedroogd, waardoor het gehalte aan watervrije saponine werd gevonden. De saponine, voor de polarisatie gebruikt, werd hierop omgerekend.

Bij het drogen bij 105 à 110° werden de fracties eenigszins geelbruin getint. Bij lagere temperatuur werd geen constant gewicht bereikt.

Een oplossing van fractie 1, bevattende in 10 c.c. 1,216 gm. droge saponine, gaf een draaiing van $-3,22^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 1,216} \times -3,22^\circ = -13,2^\circ.$$

Bij fractie 2 gaf een oplossing, bevattende in 10 c.c. 0,807 gm., een draaiing van $-0,75^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,807} \times -0,75^\circ = -4,6^\circ.$$

Bij fractie 3 gaf een oplossing, bevattende in 10 c.c. 0,655 grm., een draaiing van $+4,03^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,655} \times 4,03^\circ = +30,8^\circ.$$

Van fractie 4 werd een oplossing in spiritus van 70 % onderzocht. Een oplossing, bevattende 0,229 gram in 10 c.c., gaf een draaiing van $+1,68^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,229} \times +1,68^\circ = +37^\circ.$$

Birotatie heb ik bij de verschillende fracties niet kunnen waarnemen; de draaiing, dadelijk na de bereiding van de oplossingen, was dezelfde, als die een dag daarna.

Ook werd nagegaan, of na splitsing van fractie 1 in twee fracties de draaiing van beide dezelfde was.

Van fractie 1 werd daartoe 3 gram onder verwarming in absoluten alcohol opgelost. Bij bekoeling zette zich een deel af (fractie 1 A).

De oplossing werd afgegoten; de saponine werd daaruit met overmaat van aether gepraecipiteerd. Het praecipitaat werd afgefiltreerd en door drogen in een vacuumexsiccator boven zwavelzuur van alcohol en aether bevrijd (fractie 1 B).

De fractie 1 A werd weer opgelost in alcohol, met overmaat van aether gepraecipiteerd en gedroogd zooals fractie 1 B.

Van fractie 1 A was c. 1,7 grm., van fractie 1 B, c. 1,2 grm. verkregen.

Een oplossing in water van fractie 1 A, bevattende op 10 c.c. 0,727 grm. saponine, gaf een draaiing van $-2,05^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,727} \times -2,05^\circ = -14,1^\circ.$$

Een oplossing van fractie 1 B, bevattende op 10 c.c. 0,689 grm., gaf een draaiing van $-1,45^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,689} \times -1,45^\circ = -10,5^\circ.$$

De twee fracties hebben dus verschillende draaiing.

Met *zwavelzuur* overgoten, gaven de verschillende fracties de bekende kleurreactie.

De poeders werden eerst zwak oranjegeel getint. Ze losten langzamerhand in het zwavelzuur op, dat ook die kleur aannam. Na eenigen tijd aan de lucht te hebben gestaan, werden de vloeistoffen van den rand uit purperkleurig. Deze kleuren bleven eenige uren bestendig.

Langzamerhand scheidde zich uit de verbleekende oplossing van fractie 1 een lichtbruin bezinksel af. De oplossing werd ten slotte kleurloos.

Fractie 2 gedroeg zich als fractie 1. Echter was het bezinksel meer donkerbruin.

Bij fractie 3 werd de oplossing langzamerhand donker-violet, terwijl een donker bezinksel werd afgescheiden. Ten slotte werd de oplossing kleurloos, het bezinksel grijs.

Bij fractie 4 ontstond na eenigen tijd een weinig gekleurd bezinksel, terwijl de oplossing kleurloos werd.

Met *sublimaat* ontstond in de oplossingen der fracties 1, 2 en 3 in water geen praecipitaat, ook niet bij verwarming.

Met NESSLERS *reagens* trad bij oplossingen van de fracties 1, 2 en 3 in water bij gewone temperatuur geelkleurig op. Bij verwarming ontstond een bruin praecipitaat, dat spoedig grijs werd.

Met *ferrichloride* ontstonden in de waterige oplossingen van de fracties 1 en 3 geen verkleuringen.

Met *verzadigd barytwater* gaf alleen fractie 3 een neerslag, in water oplosbaar.

Verhouding tot neutraal loodacetaat en basische loodacetaten. Met een oplossing van neutraal loodacetaat verwarmd, gaf de oplossing van fractie 3 in water een zwakke troebeling. De oplossingen van fractie 1 en 2 bleven helder.

Met loodazijn tot koken verwarmd, gaf de oplossing van fractie 3 een vlokkelig praecipitaat, zelfs in een verdunning 1 : 400. Na affiltreeren van dit praecipitaat, gaf ammonia in het filtraat nog een overvloedig, vlokkelig neerslag.

Loodazijn gaf bij de fracties 1 en 2, ook in oplossingen 1 : 10, bij verwarming geen praecipitaat.

Met één-basisch loodacetaat in overmaat verwarmd, gaven

oplossingen 1 : 40 van de fracties 1 en 2 overvloedige praecipitaten. In het filtraat gaf ammonia een vlokkig praecipitaat. Oplossingen 1 : 500 gaven, met één-basisch loodacetaat verwarmd, geen praecipitaten; door toevoeging van ammonia ontstonden neerslagen.

Om na te gaan den invloed, die fractie 1 op de praecipiteerbaarheid van fractie 3 uitoefent, werd de volgende mengproef genomen:

Een oplossing werd bereid, bevattende fractie 3, 1 : 400 en fractie 1, 1 : 100. Bij verwarming met loodazijn ontstond geen praecipitaat. Bij een oplossing van fractie 3, 1 : 400, zonder toevoeging van fractie 1, werd met loodazijn wel een praecipitaat verkregen.

De aanwezigheid van een belangrijke hoeveelheid fractie 1 belette dus het praecipiteeren van fractie 3.

Bij langdurige verwarming van de fracties 1 en 2 met loodazijn ontstond wel een praecipitaat, dat niet vlokkig was. Wellicht is dit een gevolg van de splitsing van de saponine door het alkalisch reageerend basisch loodacetaat.

Een oplossing, verkregen door een mengsel van 1 deel fractie 4 en 5 deelen fractie 1 in water op te lossen, gaf, met neutraal loodacetaat verwarmd, een opalescentie, met loodazijn een praecipitaat.

Elementair-analyse. De fracties bevatten slechts sporen asch (blz. 25).

Op stikstof werd gereageerd met de reactie van LASSAIGNE volgens de wijziging van CASTELLANA.¹⁾ Deze wijziging bestaat hierin, dat de te onderzoeken stof wordt verhit, in plaats van met natrium, met een mengsel van magnesium en uitgedroogd natriumcarbonaat (of kaliumcarbonaat). Hierdoor kan inniger menging van de op elkaar inwerkende stoffen verkregen worden.

Met 25 milligram der fracties 1, 2 en 4 werd geen reactie verkregen. Fractie 3 gaf echter een zwakke stikstofreactie.

¹⁾ Gaz. chim. ital. 34. II p. 357 naar Pharmaceut. weekbl. dl. 43 (1906) p. 1071.

Voor de bepaling van het gehalte aan koolstof en waterstof, werden de stoffen verbrand in een aan beide uiteinden open verbrandingsbuis, in een stroom van zuurstof.

Daar de gedroogde saponinen aan de lucht zeer snel water aantrokken, werd telkens de saponine, voor één analyse bestemd, in het verbrandingsschuitje bij 105 à 110° tot constant gewicht gedroogd; het schuitje werd gewogen in een gesloten weegbuisje.

Bij de langdurige droging, noodig om bij benadering constant gewicht te verkrijgen, werden de saponinen een weinig bruingeel getint.

De gewichten in het volgende overzicht hebben betrekking op de gedroogde saponinen.

Fractie 1.

I 0,1632 grm. gaf 0,1156 grm. water en 0,3458 grm. kool-dioxyde;

II 0,1585 grm. gaf 0,1119 grm. water en 0,3361 grm. kool-dioxyde.

De samenstelling, hieruit berekend, is:

(H = 1,008; O = 16,00; C = 12,00)

I 7,93 % waterstof; 57,79 % koolstof; 34,28 % zuurstof;

II 7,90 % » ; 57,83 % » ; 34,27 % » .

Het gemiddelde is:

7,91 % waterstof; 57,81 % koolstof; 34,28 % zuurstof.

Fractie 2.

I 0,1976 grm. gaf 0,1436 grm. water en 0,4241 grm. kool-dioxyde;

II 0,2504 grm. gaf 0,1793 grm. water en 0,5356 grm. kool-dioxyde.

De samenstelling, hieruit berekend, is:

I 8,13 % waterstof; 58,54 % koolstof; 33,33 % zuurstof;

II 8,01 % » ; 58,34 % » ; 33,65 % » .

Het gemiddelde is:

8,07 % waterstof; 58,44 % koolstof; 33,49 % zuurstof.

Fractie 3.

I 0,1735 grm. gaf 0,1270 grm. water en 0,3931 grm. kool-dioxyde;

II 0,1808 grm. gaf 0,1303 grm. water en 0,4059 grm. kool-dioxyde.

De samenstelling, hieruit berekend, is:

I 8,19 % waterstof; 61,63 % koolstof; 30,18 % zuurstof (+ stikstof);

II 8,06 % waterstof; 61,23 % koolstof; 30,71 % zuurstof (+ stikstof).

Het gemiddelde is:

8,12 % waterstof; 61,43 % koolstof; 30,45 % zuurstof (+ stikstof).

Van de 1^{ste} naar de 3^{de} fractie neemt dus het gehalte aan koolstof en waterstof toe.

Van fractie 4 moesten door de geringe hoeveelheid beschikbare stof de elementair-analyses achterwege blijven.

Verhouding tot bloed. Voor dit onderzoek werden twee mengsels gebruikt van gedefibrineerd runderbloed met een chloornatriumoplossing van 0,8 %; het eene bevatte 1 grm. bloed op 100 c.c. mengsel (bloedmengsel 1 : 100), het andere 1 grm. bloed op 500 c.c. mengsel (bloedmengsel 1 : 500).

Werden in het bloedmengsel 1 : 100 de fracties 1, 2 en 3 opgelost in een concentratie 1 : 40, dan trad geen haemolyse op.

Werden in het bloedmengsel 1 : 500, de fracties 1, 2 en 3 opgelost in een concentratie 1 : 40, dan trad in een half uur geen zichtbare haemolyse op. Na 42 uur waren bij fractie 1 de bloedlichaampjes bezonken, de oplossing was ongekleurd; bij fractie 2 was ook een bezinksel van bloedlichaampjes, de oplossing was zwak gekleurd; bij fractie 3 was nauwelijks een bezinksel, de oplossing was rood gekleurd.

Bij een controleproef met het bloedmengsel 1 : 500, zonder saponine, was de oplossing na 42 uur niet gekleurd, de bloedlichaampjes waren bezonken.

Fractie 1 is dus niet, de fracties 2 en 3 slechts in geringe mate haemolytisch.

Daar de mogelijkheid bestond, dat niet-haemolytische saponine de bloed ontledende werkzaamheid van een hae-

molytisch bestanddeel belette, werden de volgende proeven genomen:

Oplossingen van de groene saponine (uit de ruwe saponine verkregen door uitschudding van de spiritueuze oplossing met magnesiumoxydehydraat, blz. 21) werden onderzocht tegenover een bloedmengsel 1 : 100.

Een oplossing van deze groene saponine 1 : 3000 gaf in 2½ minuut volledige haemolyse; een oplossing 1 : 4000 in 5 minuten; een oplossing 1 : 6000 in 15 minuten.

Nu werd het haemolytisch vermogen onderzocht van een mengsel van niet-haemolytische saponine (fractie 1) en groene saponine.

Een mengsel, bevattende groene saponine in de verhouding 1 : 4000, fractie 1 in de verhouding 1 : 40, en bloed in de verhouding 1 : 100, was in een uur nog niet veranderd. Na 18 uur was gedeeltelijke haemolyse ingetreden.

Een mengsel, bevattende groene saponine 1 : 4000 en bloed 1 : 500, werd dadelijk helder. Hetzelfde mengsel, waaraan toegevoegd fractie 1 in de verhouding 1 : 40, was pas na een uur helder.

Een groote overmaat van niet-haemolytische saponine vermindert (of vertraagt) dus wel de haemolytische werking van de groene saponine; echter was toevoeging van 1 % groene saponine aan de niet-haemolytische saponine goed aan te toonen.

Ook het haemolytische vermogen van fractie 4, opgelost met behulp van 5 deelen fractie 1, werd onderzocht.

Een oplossing, bevattende fractie 4 in de verhouding 1 : 250 en bloed 1 : 100, was in 24 uur helder en lakkleurig. Met fractie 4 in de verhouding 1 : 500 trad geen haemolyse op.

VERDER ONDERZOEK VAN FRACTIE 1.

Bij het vergelijkend onderzoek van de fracties was gebleken, dat deze stoffen bevatten, in hun verhouding tot

magnesiumsulfaat en basisch loodacetaat, en in hun oplosbaarheid in water en alcohol, belangrijk van elkaar verschillend.

Deze verschillen schenen mij echter niet geschikt om er een directe scheiding op te gronden, daar de stoffen zoodanigen invloed op elkaar uitoefenden, dat eenerzijds de niet praecipiteerbare stof de praecipitatie van de andere stof geheel of gedeeltelijk belette, anderzijds de praecipiteerbare stof een gedeelte van de, op zichzelf niet praecipiteerbare, stof medesleepte. (Zie verhouding tot magnesiumsulfaat en basische loodacetaten blz. 30 en 34).

't Kwam mij daarom voor, dat het alleen mogelijk zou zijn, door herhaald fractionneeren bij benadering tot enkelvoudige stoffen te geraken.

Voor fractie 3 zou herhaalde praecipitatie met loodazijn kunnen gebruikt worden of praecipitatie met magnesiumsulfaatoplossingen. Wegens de kleine hoeveelheid, die ik slechts van deze fractie had, heb ik dit niet uitgevoerd.

Voor de behandeling van fractie 1 kwam in aanmerking fractionneeren uit absoluten alcohol. Bestond fractie 1 in hoofdzaak uit één stof, moeilijk in kouden alcohol oplosbaar, met bijmengsels van de stoffen uit fractie 3 (en 4), dan zouden deze bijmengsels door fractionneeren uit alcohol kunnen worden verwijderd.

De fractionneering uit absoluten alcohol werd, als volgt, uitgevoerd.

12,5 Grm. luchtdroge saponine werd onder verwarming opgelost in 120 c.c. absoluten alcohol. Daarna werd de oplossing afgekoeld. Dit geschiedde door de kolf, nagenoeg geheel ondergedompeld, te plaatsen in een pan met water van c. 50°. Ik liet het water aan de lucht afkoelen. Bij c. 45° begon de afscheiding uit de oplossing. De afgescheiden saponine zette zich tegen den wand van de kolf af.

De saponine, die bij het laatste gedeelte van de afkoeling werd afgezet, zag er voor 't bloote oog eenigszins kristallijn uit. Bij microscopisch onderzoek bleek ze te bestaan uit bolletjes, niet zichtbaar dubbelbrekend.

Na afkoeling (tot 4°) werd de oplossing van de neergeslagen saponine afgeschonken. De kolf en het praecipitaat werden met eenige c.c. alcohol nagespoeld.

Uit de alcoholische oplossing werd de saponine teruggewonnen door praecipitatie met het tienvoudige volume aether. Het neerslag werd verzameld, met aether nage-wasschen en in een vacuumexsiccator boven zwavelzuur van aether en alcohol bevrijd. Op deze wijze werd de saponine uit de oplossing afgescheiden en gedroogd zonder verwarming.

De afgescheiden saponine was zeer volumineus en zwak bruin getint. De opbrengst, na een nacht drogen in een vacuumexsiccator boven zwavelzuur, was c. 2 gram (*fractie 1a*).

Uit de saponine, bij de eerste fractionneering uit den alcohol neergeslagen, werden op de zelfde wijze nog 5 fracties afgescheiden (*fractie 1b tot en met 1f*). Nu echter werd telkens uit 100 c.c. absoluten alcohol gefractionneerd.

Deze fracties waren volkomen wit; de geconcentreerde oplossingen waren nagenoeg kleurloos.

De opbrengst wisselde bij deze fracties (na een nacht drogen in een vacuumexsiccator boven zwavelzuur) tusschen 1,750 gram en 1,500 gram.

De nog in de kolf achtergebleven saponine werd in alcohol opgelost. De troebele oplossing werd door afzuigen door asbest gefiltreerd. Uit de gefiltreerde oplossing werd de saponine door praecipiteeren met aether afgescheiden (*fractie 1g*). De opbrengst was c. 1,2 gram.

Onderzoek der fracties. Tegenover FEHLINGS proefvocht en oplossingen van verschillend-basische loodacetaten gedroegen zich de fracties 1a en 1g als de oorspronkelijke fractie 1.

Werden oplossingen in absoluten alcohol van de fracties 1a en 1g gepraecipiteerd met het tienvoudige volume aether, dan lieten, in beide gevallen, de gefiltreerde alcoholisch-aetherische oplossingen bij verdamping geringe, in water niet geheel oplosbare resten achter.

Bij praecipitatie uit alcohol met het viervoudige volume aether, lieten de gefiltreerde alcoh. aeth. oplossingen resten achter, die, op een zwakke opalescentie na, in water oplossen. Deze oplossingen gaven, met loodazijn verwarmd, nog neerslagen.

Het *draaiingsvermogen* der fracties voor D-licht werd bij c. 10° in een 2 d.M. buis in waterige oplossing bepaald, op de zelfde wijze, als dat bij de hoofdfracties had plaats gehad.

Een oplossing van fractie 1 a, bevattende op 10 c.c. 0,465 grm., gaf een draaiing van $-0,92^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,465} \times -0,92^\circ = -9,8^\circ.$$

Een oplossing van fractie 1 b, bevattende op 10 c.c. 0,800 grm., gaf een draaiing van $-1,83^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,800} \times -1,83^\circ = -11,4^\circ.$$

Een oplossing van fractie 1 c, bevattende op 10 c.c. 0,489 grm., gaf een draaiing van $-1,13^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,489} \times -1,13^\circ = -11,6^\circ.$$

Een oplossing van fractie 1 d, bevattende op 10 c.c. 0,487 grm., gaf een draaiing van $-1,20^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,487} \times -1,20^\circ = -12,3^\circ.$$

Een oplossing van fractie 1 e, bevattende op 10 c.c. 0,482 grm., gaf een draaiing van $-1,23^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,482} \times -1,23^\circ = -12,8^\circ.$$

Een oplossing van fractie 1 f, bevattende op 10 c.c. 0,432 grm., gaf een draaiing van $-1,21^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,432} \times -1,21^\circ = -13,9^\circ.$$

Een oplossing van fractie 1 g, bevattende op 10 c.c. 0,498 grm., gaf een draaiing van $-1,55^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,498} \times -1,55^\circ = -15,9^\circ.$$

De absolute waarde der negatieve draaiing neemt dus van fractie 1a tot fractie 1g voortdurend toe. Uit de voor de soortelijke draaiing gevonden waarden mag wel worden afgeleid, dat fractie 1g nog geen enkelvoudig lichaam is. Ook is geen nadering tot een limiet merkbaar.

Bij de fracties 1b en 1c werden, weinig van elkaar afwijkende, waarden gevonden. 't Zou dus mogelijk zijn, dat we hier met nagenoeg enkelvoudige stoffen te doen hadden.

Om dit te onderzoeken, werd een mengsel van gelijke deelen van fractie 1b en 1c door fractionneeren uit absoluten alcohol in twee nagenoeg even groote fracties verdeeld. De uit de eerste alcoholische oplossing verkregen fractie werd A, de andere B genoemd.

Een oplossing van fractie A, bevattende in 10 c.c. 0,487 grm., gaf een draaiing van $-0,99^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,487} \times -0,99^\circ = -10,2^\circ.$$

Een oplossing van fractie B, bevattende in 10 c.c. 0,515 grm., gaf een draaiing van $-1,31^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,515} \times -1,31^\circ = -12,7^\circ.$$

Het mengsel van de fracties 1b en 1c blijkt dus ook geen enkelvoudige stof te zijn.

Van de fracties 1b en 1g werden *elementair-analyses* gedaan.

Fractie 1b.

I 0,1678 grm. gaf 0,1196 grm. water en 0,3562 grm. kooldioxyde;

II 0,1489 grm. gaf 0,1083 grm. water en 0,3160 grm. kooldioxyde;

III 0,1568 grm. gaf 0,1122 grm. water en 0,3345 grm. kooldioxyde;

IV 0,1566 grm. gaf 0,1136 grm. water en 0,3336 grm. kooldioxyde.

De samenstelling, hieruit berekend, is:

I 7,98 % waterstof; 57,89 % koolstof; 34,13 % zuurstof;

II 8,14 % waterstof; 57,88 % koolstof; 33,98 % zuurstof;
 III 8,00 % » ; 58,18 % » ; 33,82 % » ;
 IV 8,12 % » ; 58,10 % » ; 33,78 % » .

Het gemiddelde is:

8,06 % waterstof; 58,01 % koolstof; 33,97 % zuurstof.

Fractie 1 g.

I 0,1674 grm. gaf 0,1192 grm. water en 0,3529 grm. kooldioxyde;

II 0,1910 grm. gaf 0,1332 grm. water en 0,4024 grm. kooldioxyde;

III 0,2654 grm. gaf 0,1879 grm. water en 0,5571 grm. kooldioxyde.

De samenstelling, hieruit berekend, is;

I 7,97 % waterstof; 57,49 % koolstof; 34,54 % zuurstof;

II 7,80 % » ; 57,47 % » ; 34,73 % » ;

III 7,92 % » ; 57,25 % » ; 34,83 % » .

Het gemiddelde is:

7,89 % waterstof; 57,40 % koolstof; 34,70 % zuurstof.

Fractie 1 g bevat dus minder koolstof en waterstof dan fractie 1 b.

De samenstelling van fractie 1 b komt overeen met die van den term $C_{23} H_{38} O_{10}$ van de reeks van KOBERT ($C_n H_{2n-8} O_{10}$).

Voor deze formule zou de samenstelling zijn:

8,08 % waterstof; 58,19 % koolstof; 33,73 % zuurstof.

Gevonden 8,06 % » ; 58,01 % » ; 33,93 % » .

Fractie 1 g komt in samenstelling overeen met den term van de reeks van KOBERT $C_{22} H_{36} O_{10}$.

Voor deze formule zou de samenstelling zijn:

7,88 % waterstof; 57,35 % koolstof; 34,77 % zuurstof.

Gevonden 7,89 % » ; 57,40 % » ; 34,70 % » .

Bij het onderzoek van de fracties was gebleken, dat, wanneer ze uit alcohol met veel aether werden neergeslagen, de aldus verkregen alcoh. aeth. oplossingen bij verdamping resten achterlieten, slechts gedeeltelijk in water oplosbaar.

Ik heb getracht door herhaalde praecipitatie uit alcohol met aether de saponine (fractie 1) van deze onoplosbare stof te bevrijden.

De bij dit onderzoek gebruikte absolute alcohol was vers bereid door destilleeren van spiritus over ongebluschte kalk. De aether was voor het gebruik met alkali en daarna met water uitgeschud, met chloorcalcium gedroogd en daarna gerezificeerd.

Een hoeveelheid saponine werd opgelost in het 100-voudige volume absoluten alcohol en met het 400-voudige volume aether gepraecipiteerd. Het neerslag werd afgefiltreerd, uitgewasschen met een mengsel van alcohol en aether (1 + 4) en in een vacuumexsiccator van aether en alcohol bevrijd.

Dit neerslag werd opnieuw in alcohol opgelost en met aether neergeslagen. Deze bewerking werd tot 16 maal herhaald. Het neerslag, bij de laatste praecipitatie verkregen, was slechts gering.

De droogresten van de telkens verkregen alcohol. aether. oplossingen waren in verhouding tot de hoeveelheden alcohol en aether, telkens gebruikt, nagenoeg even groot. Aan de lucht werden ze eenigszins vochtig. Ze losten alle troebel in water op. Deze oplossingen gaven, met loodazijn verwarmd, neerslagen. Bij de verschillende droogresten was deze reactie nagenoeg even sterk. Werden deze droogresten uit alcohol met veel aether gepraecipiteerd, dan was het neerslag geheel oplosbaar in water en gaf met loodazijn geen neerslag meer; de droogresten van de alcohol. aether. oplossingen, bij deze bewerking verkregen, waren moeilijk in water oplosbaar.

Het voorgaande maakt het zeer waarschijnlijk, dat de moeilijk in water oplosbare stof bij de bewerking ontstaat. Was al deze stof reeds aanwezig in de saponine, waarvan we zijn uitgegaan, en werd ze niet bij de bewerking gevormd, dan hadden we kunnen verwachten, dat de droogresten van de alcohol. aether. oplossingen, bij de laatste praecipitaties verkregen, deze stof niet of slechts in geringe hoeveelheid

zouden bevatten. De laatste droogresten bevatten deze stof echter even goed als de eerste.

Bij het fractionneeren uit alcohol van fractie 1 zijn telkens de verschillende onderfracties met aether neergeslagen. Door drogen in een vacuumexsiccator werden de neerslagen van alcohol en aether bevrijd. Hierbij zal dus wel eenige ontleding hebben plaats gehad.

Daar de bewerking in alle gevallen gelijk is uitgevoerd, zal dit wel weinig invloed hebben gehad op de verhouding tusschen het draaiingsvermogen van de verschillende onderfracties.

SPLITSING VAN DE SAPONINEN DOOR ZUUR.

Werden oplossingen van de saponinen in water gedurende eenigen tijd in een kokend waterbad met een verdund sterk zuur verwarmd, dan vond er splitsing plaats. Er werd een volumineus praecipitaat afgescheiden; in de oplossing bleef een stof, die FEHLINGS proefvocht reduceerde (suiker). Bij de splitsing werd een eigenaardige reuk waargenomen.

De splitsing trad gemakkelijk in. Bij verwarming in een kokend waterbad met zwavelzuur of oxaalzuur van 1 % was binnen het half uur een praecipitaat ontstaan. Met azijnzuur van 6 % ontstond in eenige uren geen praecipitaat, met azijnzuur van 30 % in een uur wel.

Volledige afsplitsing van de suiker was echter veel moeilijker te bereiken.

Een hoeveelheid van fractie 1 werd twee uur met zwavelzuur van 2 % verwarmd in een kokend waterbad. De gefiltreerde oplossing gaf toen bij koken met sterker zuur geen praecipitaat meer. Het praecipitaat werd uitgewasschen tot alle zuur was verwijderd. Bij koken met zuur kon nog suiker uit het neerslag worden afgesplitst.

Werd dit neerslag nog 6 uur met zwavelzuur van 2 % in een kokend waterbad verwarmd, dan was de splitsing

toch nog niet volkomen, daar uit het uitgewasschen neerslag door verwarmen met sterker zuur nog suiker kon worden afgesplitst.

Na verwarming in een kokend waterbad gedurende 6 uur met zwavelzuur van 4 0/0, was de afsplitsing nagenoeg volledig; het uitgewasschen neerslag gaf bij langdurige verwarming in een kokend waterbad met zwavelzuur van 4 0/0 nog slechts sporen suiker af.

Voor het onderzoek van de suikers werden van de fracties 1, 3 en 4 gedeelten met zwavelzuur van 4 0/0 gesplitst. (Fractie 4 werd hiertoe eerst in wat alcohol opgelost. Daarna werd het zwavelzuur toegevoegd, waarbij de opgeloste stof grootendeels werd afgescheiden in fijn verdeelden toestand).

Na de splitsing werden de praecipitaten afgefiltreerd en uitgewasschen met water. De filtraten werden door koken met overmaat van bariumcarbonaat geneutraliseerd. Nadat door filtreren de overmaat van bariumcarbonaat en het gevormde bariumsulfaat waren verwijderd, werden de filtraten tot kleine resten uitgedampt. Deze werden opgenomen in wat water. De zwak troebele vloeistoffen werden gefiltreerd en tot droog uitgedampt.

De aldus verkregen suikers waren geelbruin en zeer hygroscopisch.

Hiermede werden de volgende reacties uitgevoerd.

Reactie op pentose van WHEELER en TOLLENS ¹⁾. Oplossingen van de suikers in water werden vermengd met zooveel sterk zoutzuur, dat de mengsels c. 18 0/0 HCl bevatten. Deze werden met wat phloroglucine een paar minuten gekookt.

De kleur werd eerst geel, daarna roodbruin; vervolgens ontstond een neerslag. Na afkoeling werd uitgeschud met amylalcohol, waarin de kleurstof overging. De oplossingen in amylalcohol werden spectroscopisch onderzocht.

Bij het gebruikte spectroscop werd de natriumstreep op 10,0 van de schaal ingesteld. De roode (α) lithiumstreep viel dan op 9,2, de (α) kaliumstreep viel op 8,2.

¹⁾ Annalen d. Chem. Bd. 254 (1889) p. 329.

De oplossingen werden zoo sterk verdund, dat de absorptiebanden nauwlijks meer zichtbaar waren. Met behulp van een vertikalen draad werd nu de plaats bepaald, waar de band de grootste diepte had.

Arabinose en xylose gaven bij deze reactie een blauw-roode kleur en een absorptieband, waarvan de grootste diepte op 10,6 van de schaal lag (tusschen geel en groen).

Bij lactose en rhamnose, die bij deze reactie roodbruine oplossingen gaven, verkreeg ik dezen band niet; ook furfurol gaf hem niet.

De drie onderzochte suikers (uit fractie 1, 3 en 4) gaven alle dezen band.

Reactie op pentose van BIAL ¹⁾. Het hierbij gebruikte reagens was bereid uit 500 deelen zoutzuur van 25 %, 1 deel orcine en 1,5 deel van een 10 % oplossing in water van $\text{Fe}_2 \text{Cl}_6 + 12 \text{H}_2 \text{O}$.

Van dit reagens werd zooveel toegevoegd aan de oplossingen in water van de suikers, dat de mengsels c. 18 % HCl bevatten. Deze mengsels werden een paar minuten gekookt. Na bekoeling werd de kleurstof met amylalcohol uitgeschud. Deze oplossingen werden spectroscopisch onderzocht.

Furfurol gaf bij deze reactie een blauwe oplossing met een sterken absorptieband, waarvan de grootste diepte op 9,6 lag.

Arabinose en xylose gaven blauwgroene oplossingen met twee absorptiebanden van verschillende sterkte. Van den sterksten lag de grootste diepte op 8,7, van den zwaksten op 9,6 (de furfurolband).

Rhamnose (een methylpentose) gaf een groene oplossing, die spoedig bruingroen werd, met één absorptieband, waarvan de grootste diepte op 8,8 viel. Deze band valt dus nagenoeg samen met den sterken pentoseband.

Bij hexosen verkreeg ik wel zwakke, groenachtige verkleuring, maar geen absorptieband.

¹⁾ Deutsche med. Wochenschr. Bd. 28 (1902) p. 253.

De suikers van de fracties 1 en 3 gaven groene, spoedig bruinachtig groen wordende, oplossingen met twee absorptiebanden. Van den sterksten lag het maximum ongeveer op 8,7, van den zwaksten op 9,6.

De suiker uit fractie 4 gaf een blauwgroene oplossing, die echter na eenigen tijd ook bruinachtig werd. Voor het spectroscop vertoonde deze oplossing de pentosebanden.

De absorptiebanden bij deze reactie en bij die van WHEELER en TOLLENS wijzen op de aanwezigheid van pentose.

De groene en bruingroene verkleuringen bij de reactie van BIAL doen denken aan de aanwezigheid van methylpentose.

Reactie op methylpentose van OSHIMA en TOLLENS ¹⁾. Deze reactie werd eerst gedaan met rhamnose. 50 mgr. hiervan werd opgelost in 100 c.c. zoutzuur van 12 %. Nu werd gedestilleerd zoodanig, dat er, telkens wanneer 30 c.c. was overgegaan, weer 30 c.c. zoutzuur van 12 % in de destilleerkolf werd bijgevoegd.

Bij een gedeelte van het destillaat werd een gelijk volume sterk zoutzuur gevoegd en wat phloroglucine, in zoutzuur opgelost. Spoedig werd de oplossing geelbruin getint, welke kleur snel in sterkte toenam. Ten slotte zette zich een oranjekleurig praecipitaat af; de oplossing bleef zwak oranjegetint.

Vervolgt men deze methyلفurfurolreactie voor het spectroscop, dan ontstaat eerst een breede absorptieband, waarvan de grootste diepte ongeveer op 14,0 valt. Ook het violette gedeelte van het spectrum is eenzijdig geabsorbeerd. Tusschen beide geabsorbeerde gedeelten komt de blauwe kleur van het spectrum te voorschijn. Langzamerhand verdwijnt ook dit blauwe gedeelte.

Bij arabinose werd op deze wijze ook eerst een geelbruine oplossing verkregen, die voor het spectroscop den absorptieband op 14,0 echter niet vertoonde. Spoedig werd de oplossing

¹⁾ Berichte d. d. Chem. Ges. Bd. 34 (1901) p. 1425.

zwartachtig groen. Ten slotte ontstond een zwart praecipitaat. De bovenstaande oplossing was toen nauwlijks meer gekleurd.

100 mgr. van de dikke suikerstroop uit fractie 1 gaf bij deze reactie eerst snel toenemende geelbruinkleuring. Spoedig werd de oplossing donkerder, daarna groenachtig; ten slotte ontstond een donker praecipitaat; de oplossing bleef groenachtig geel.

Voor het spectroscop vertoonden zich dezelfde absorptieverschijnselen als bij rhamnose. Dit wijst op de aanwezigheid van methylfurfurol in het destillaat dus van methylpentose in de suiker.

De groene kleur van de oplossing en de donkere kleur van het praecipitaat aan het eind van de reactie worden veroorzaakt door furfurol (uit pentose).

De suiker uit fractie 4 gaf deze reactie als arabinose. Een absorptieband werd voor het spectroscop niet waargenomen.

Van fractie 3 had ik toen zeer weinig over, zoodat deze en eenige van de volgende reacties voor de suiker van fractie 3 moesten achterwege blijven. Dit geldt gedeeltelijk ook voor de suiker uit fractie 4.

Bij de reactie van WHEELER en TOLLENS en bij die van BIAL traden, tenminste bij de fracties 1 en 3, de kleuren, veroorzaakt door de pentose, niet op den voorgrond. Ze werden gemaskeerd door de kleuren van de methylpentose afkomstig, zoodat de pentose slechts spectroscopisch kon worden aangetoond.

De absorptiebanden, bij de reactie van WHEELER en TOLLENS verkregen, waren niet zeer sterk. Zoo gaf 25 milligram van de vochtige suiker uit fractie 1 een minder duidelijken band bij deze reactie dan 2 milligram arabinose, wanneer de reacties op de zelfde wijze werden uitgevoerd. Bij gelijke verdunning verdween bij de suiker uit fractie 1 de band eerder dan bij de arabinose.

Later (blz. 53) is medegedeeld een bepaling van methyl-

pentose + pentose in fractie 1. Er werd gevonden, dat nagenoeg de helft van de suiker uit deze beide bestond. In verband met de zwakke pentosereactie van deze suiker is 't dus wel waarschijnlijk, dat ze naast veel methylpentose, weinig pentose bevat.

De *reactie van SELIWANOFF*¹⁾ op ketosen gaf bij de suikers van de fracties 1 en 4 geen duidelijk positief resultaat. (Afwezigheid van een eenigszins belangrijke hoeveelheid fructose).

Verhouding tot phenylhydrazinehydrochloride + natriumacetaat bij gewone temperatuur. De invloed van deze reagentia op de suikers van de fracties 1 en 4 werd nagegaan om te weten of er ook mannose in voorkwam.

Eerst werd nagegaan, hoe mannose en eenige andere suikers en mengsels van suikers zich tegenover deze reagentia gedroegen.

Op 1 deel suiker werd gebruikt 2 deelen phenylhydrazinehydrochloride en 3 deelen natriumacetaat.

In geconcentreerde oplossingen (1:10) gaven arabinose en rhamnose hiermede gedeeltelijk kristallijne praecipitaten. Glucose gaf geen neerslag. In oplossingen 1:50 ontstond bij arabinose een gering kristallijn neerslag, bij rhamnose niet. Mannose gaf in oplossingen 1:500 nog een duidelijk kristallijne afscheiding van hydrazon.

In oplossingen, bevattende glucose 1:50 en arabinose 1:50, ontstond geen praecipitaat, evenmin in oplossingen met glucose 1:50 en rhamnose 1:50. Bevatten deze oplossingen echter nog mannose 1:500, dan ontstonden kristallijne neerslagen, echter met niet zoo goed gevormde kristallen, als bij mannose 1:500 zonder bijmengsels.

De suikers van fractie 1 en 4 gaven in oplossingen 1:20 wel troebeling, maar deze was niet kristallijn; waarschijnlijk was er dus geen belangrijke hoeveelheid mannose aanwezig (minder dan 5 %).

Verhouding tot phenylhydrazinehydrochloride + natrium-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 20 (1887) p. 181.

acetaat bij verwarming. Ik heb getracht, door microscopische beschouwing van den vorm en de groepeerings van de kristallen van hun phenylosazonen, eenig inzicht in de aard der suikers te verkrijgen.

De osazonen werden bereid door één deel van de suiker, opgelost in 100 deelen water, met 2 deelen phenylhydrazinehydrochloride en 3 deelen natriumacetaat of met de dubbele hoeveelheden¹⁾ gedurende een uur in een kokend waterbad te verwarmen. Daarna liet ik het mengsel in het waterbad afkoelen.

Voor vergelijking werden gebruikt glucose, galactose, arabinose, xylose en rhamnose. Deze suikers geven alle goed van elkaar te onderscheiden osazonen (mannose geeft eerst een hydrazon en dan een osazon als glucose). Ook bij mengsels van gelijke deelen van twee van bovengenoemde suikers was het mogelijk, de osazonen van beide componenten (soms wel wat veranderd) terug te vinden.

Bij de suiker uit fractie 1 verkreeg ik twee soorten kristallen:

- a.* lange, rechte naalden, gewoonlijk tot schoofvormige bundels vereenigd, in vorm overeenkomende met glucosazon.
- b.* langwerpige, zeshoekige plaatjes, dikwijls tot rosetten vereenigd. Deze plaatjes — wellicht van een methylpentosazon — kwamen niet overeen met één van de ter vergelijking gebruikte osazonen.

Bij de suiker uit fractie 3 verkreeg ik:

- a.* naaldbundels als van glucosazon.
- b.* plaatjes tot rosetten vereenigd. Sommige kwamen overeen met de plaatjes (*b*) uit de suiker van fractie 1. Bij de meeste waren de hoeken afgerond. Sommige waren zelfs elliptisch.
- c.* eenige gebogen, draadvormige, vertakte elementen.

Bij de suiker uit fractie 4 kwamen voor:

- a.* naaldbundels als van glucosazon.

¹⁾ Om goed ontwikkelde kristallen te verkrijgen, was het noodig bij rhamnose en galactose op 1 deel suiker 4 deelen phenylhydrazinehydrochloride en 6 deelen natriumacetaat te gebruiken.

b. gele massa's van uit één of meer centra marmerachtig geaderd; ook kleine naaldjes en lange dooreen gewarde draden. Dit zelfde beeld geeft ook arabinosazon, geen van de andere voor vergelijking gebruikte osazonen.

Gistproef. 100 mgr. van de suiker van fractie 1 werd opgelost in water en met gist vermengd. Dit mengsel werd in een gistbuisje in een thermostaat op 34° gehouden. Er had sterke koolzuurontwikkeling plaats. Bij een controleproef zonder suiker vond slechts geringe gasontwikkeling plaats.

In de suiker van fractie 1 is dus een gistbaar gedeelte (hexose) aanwezig.

Samenvatting.

Bij het kwalitatief onderzoek op suikers werden dus de volgende resultaten verkregen:

De suiker van fractie 1 bevat een hexose (waarschijnlijk glucose), methylpentose en een weinig pentose.

De suiker van fractie 3 komt wel in hoofdzaak met die van fractie 1 overeen.

De suiker van fractie 4 bevat waarschijnlijk glucose en arabinose (ten minste een pentose).

Van de fracties 1 en 3 werd *de hoeveelheid van de splitsingsproducten* bepaald; van fractie 4 alleen de hoeveelheid sapogenine, daar de suiker bij het kwalitatief onderzoek was verbruikt.

(Fractie 1 was verkregen door, onder achterhouding van kleine hoeveelheden, de onderfracties bij elkaar te voegen, uit de oorspronkelijke fractie 1 met alcohol verkregen).

Van fractie 1 werd een hoeveelheid, overeenkomende met 0,5084 grm. bij 105° à 110° gedroogde saponine, met zwavelzuur van 4% gedurende 6 uur in een kokend waterbad verhit.

Het volumineuze praecipitaat werd afgefiltreerd en volkomen uitgewassen met water. Bij 110° gedroogd tot constant gewicht, woog het 0,1981 grm. = 38,8%. Het was bruin gekleurd.

Het filtraat werd met barytwater bijna geneutraliseerd. De zwak zure vloeistof werd gefiltreerd en grootendeels uitgedampt. Ze werd daarna weer gefiltreerd en met water tot 105 c.c. gebracht.

In 25 c.c. van deze oplossing werd het suikergehalte bepaald volgens de methode LEHMANN-SCHOORL¹⁾ met 2 minuten kooktijd.

Bij de bepaling van de suiker werd 21,6 c.c. $\frac{1}{10}$ normaal thiosulfaat minder verbruikt, dan bij de titerstelling van het proefvocht.

Bij een tweede bepaling werd dezelfde uitkomst verkregen.

Berekend op glucose volgens de tabel, behoorende bij deze bepaling, geeft dit een hoeveelheid van 0,0730 grm. Dit wordt voor de geheele hoeveelheid suikeroplossing (105 c.c. uit 0,5084 grm. fractie 1) $4,2 \times 0,0730 = 0,3066$ grm. = 60,3 %.

Bij 0,4819 grm. fractie 3 werd gevonden 0,2605 grm. sapogenine = 54,1 %. Bij de titratie van de suiker in 25 c.c. van 105 c.c. oplossing, werd bij twee bepalingen gevonden 16,03 en 16,00 c.c. thiosulfaat, overeenkomende met 0,0529 grm. glucose. Dit wordt voor de heele hoeveelheid $4,2 \times 0,0529$ grm. = 0,2222 grm. = 46,1 %.

Fractie 1 gaf dus 38,8 % sapogenine en 60,3 % suiker, als glucose berekend; fractie 3 gaf 54,1 % sapogenine en 46,1 % suiker.

Verder gaf bij splitsing

0,7237 grm. fractie 1: 0,2782 grm. sapogenine = 38,5 %;

0,7078 grm. fractie 3: 0,3819 grm. sapogenine = 53,9 %.

De suiker, verkregen bij de twee laatste splitsingen, waarbij gevoegd werd een gedeelte van de overeenkomstige suiker, bij de eerste bepalingen overgehouden, werd gebruikt voor pentose-(methylpentose)-bepalingen.

Deze werden gedaan volgens de zoutzuur-phloroglucine methode van KRÜGER en TOLLENS.²⁾

¹⁾ Ned. Tijds. v. Pharm., Chem. en Tox. dl. 11 (1899) p. 209.

²⁾ Zeitschr. für angew. Chem. Jahrg. 1896, p. 40.

De suiker uit 0,9416 grm. saponine, fractie 1, gaf hierbij 0,2422 grm. furfurol-(methyلفurfurol)-phloroglucide ¹⁾, overeenkomende met 0,255 grm. pentose = 27,2 % of met 0,301 grm. methylpentose ²⁾ = 32,0 %.

De suiker uit 0,9143 grm. fractie 3 gaf 0,1532 grm. furfurol-(methyلفurfurol)-phloroglucide, overeenkomende met 0,160 grm. pentose = 17,5 % of met 0,209 grm. methylpentose = 22,9 %.

(Duplo-bepalingen moesten uit gebrek aan een voldoende hoeveelheid saponine achterwege blijven.)

Bij de splitsing van deze saponinestoffen treedt altijd een aromatische reuk op. Er komt dus nog een vluchtige stof vrij, die noch als sapogenine, noch als suiker in rekening is gebracht.

Werkelijk geven de splitsingsanalyses een deficit, indien men aanneemt, dat bij de splitsing water wordt opgenomen.

Bij een gehalte van 38,8 % sapogenine in fractie 1, zouden we, indien op elk molecule suiker één molecule water was opgenomen, wel 68 % suiker hebben moeten vinden (gevonden 60,3 %).

In hoeverre een dergelijk verschil aan het vluchtige bijmengsel moet worden toegeschreven, is moeilijk uit te maken. Het gevonden gehalte aan suiker is waarschijnlijk te laag, daar de methylpentose wel zwakker zal reduceeren dan glucose (tenminste rhamnose en fucose doen dit). Ook kan wel een klein gedeelte van de suiker bij het langdurige verhitten met zwavelzuur gedestruëerd zijn, om van andere oorzaken niet te spreken.

De bij de splitsing van de fracties 1 en 3 verkregen *sapogeninen* werden nog eens uitgekookt met verdund zwavel-

¹⁾ Daar ik bij de uitvoering dezer bepalingen nog niet wist, dat er methylpentose in de suiker voorkwam, werden furfurol- en methyلفurfurol-phloroglucide niet afzonderlijk bepaald.

²⁾ ELLETT EN TOLLENS. Berichte d. d. chem. Ges. Bd. 38 (1905) p. 492.

zuur. Omdat ze moeilijk met water gemengd konden worden, werden ze in wat alcohol opgelost; ter verwijdering van de papiervezels werden de oplossingen gefiltreerd; daarna werd het grootste deel van den alcohol afgedestilleerd.

Bij de achterblijvende oplossingen werd zwavelzuur van 5 % gevoegd; hierdoor werden de sapogeninen geleichmatig afgescheiden. Vervolgens werd in een kokend waterbad verhit, eerst in een open kolf, totdat door het uitdrijven van een deel van den alcohol de vloeistof niet meer kookte, vervolgens 6 uur met opzetbuis.

Daarna werd de sapogenine weer afgefiltreerd; het filtraat werd, na verwijdering van het zwavelzuur met bariumcarbonaat, tot een paar c.c. uitgedampt. In beide gevallen gaf het uitgedampte filtraat nog een spoor reductie met FEHLINGS proefvocht.

De sapogeninen werden nog eens op deze wijze uitgekookt. Nu echter reduceerden de, van zwavelzuur grootendeels bevrijde, uitgedampte filtraten FEHLINGS proefvocht niet meer.

De bruine gekleurde sapogeninen werden door koken in alcoholische oplossing met dierlijke kool nagenoeg geheel ontkleurd.

De door uitdamping van de gefiltreerde oplossingen afgescheiden sapogeninen waren in water onoplosbaar, in absoluten alcohol gemakkelijk, in aether weinig oplosbaar.

Met verdund alkali verwarmd, losten ze nauwelijks op. Werden ze echter eerst in wat alcohol opgelost en werd daarna alkali toegevoegd en vervolgens veel water, dan bleven de oplossingen nagenoeg helder. Met zuur ontstonden in deze oplossingen overvloedige praecipitaten.

In ijsazijn waren de sapogeninen oplosbaar, ofschoon niet gemakkelijk. Bij staan aan de lucht werden de sapogeninen geleichmatig, niet kristallijn afgescheiden.

Bij *verhitting* werden de sapogeninen beneden de smeltpunten reeds bruin gekleurd.

De sapogenine uit fractie 1 begon bij c. 281° samen te

pakken en was bij 286° gesmolten tot een heldere, bruine vloeistof.

De sapogenine uit fractie 3 begon bij c. 274° samen te pakken en was bij 280° gesmolten. (Deze temperaturen zijn ongecorrigeerd.)

Het *draaiingsvermogen* werd bepaald in absoluten alcohol bij c. 20° in een buis van 2 d.M.

Een oplossing van de sapogenine uit fractie 1, bevattende op 10 c.c. 0,1388 grm. gedroogde sapogenine, gaf een draaiing van $+1,82^{\circ}$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,1388} \times +1,82^{\circ} = +66^{\circ}.$$

Een oplossing van de sapogenine uit fractie 3, bevattende op 10 c.c. 0,1404 grm. sapogenine, gaf een draaiing van $+1,67^{\circ}$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,1404} \times +1,67^{\circ} = +59^{\circ}.$$

Met de reactie van LASSAIGNE, volgens de wijziging van CASTELLANA, kon bij geen van beide sapogeninen in 25 mgr. stikstof worden aangetoond.

Elementair-analyses van de sapogeninen werden uitgevoerd, als die van de saponinen.

Bij 110° werden de sapogeninen tot constant gewicht gedroogd.

De sapogeninen bevatten een weinig asch (c. 0,5 %). De in de volgende opgave voorkomende hoeveelheden sapogenine zijn de verschillen tusschen het gewicht van het schuitje + de gedroogde sapogenine voor de verbranding en dat van het schuitje + de asch na de verbranding.

Sapogenine uit fractie 1.

I 0,1192 grm. gaf 0,1092 grm. water en 0,3310 grm. kooldioxyde;

II 0,1112 grm. gaf 0,1010 grm. water en 0,3081 grm. kooldioxyde.

De samenstelling, hiermede overeenkomende is:

I 10,2 % waterstof; 75,8 % koolstof; 14,0 % zuurstof;

II 10,1 % waterstof; 75,6 % koolstof; 14,3 % zuurstof.

Het gemiddelde is:

10,2 % waterstof; 75,7 % koolstof; 14,1 % zuurstof.

Sapogenine uit fractie 3.

I 0,1060 grm. gaf 0,0943 grm. water en 0,2884 koolzuur;

II 0,0784 grm. » 0,0689 » » » 0,2033 » .

De samenstelling, hiermede overeenkomende, is:

I 9,9 % waterstof; 74,2 % koolstof; 15,9 % zuurstof;

II 9,8 % » ; 73,9 % » ; 16,3 % » .

Het gemiddelde is:

9,9 % waterstof; 74,1 % koolstof; 16,0 % zuurstof.

Neemt men aan, dat bij de splitsing uit de saponine uitsluitend sapogenine en suiker ontstaat en dat daarbij op elk molecule suiker één molecule water wordt opgenomen, dan kan men onder de benaderende aanname, dat de suiker uit aequimoleculaire hoeveelheden methylpentose en hexose bestaat, uit het gehalte aan sapogenine en haar samenstelling de samenstelling van de saponine berekenen.

Voor fractie 1 werd aldus berekend:

7,96 % waterstof; 57,91 % koolstof; 34,13 % zuurstof.

Gevonden was:

7,91 % waterstof; 57,81 % koolstof; 34,28 % zuurstof. ¹⁾

Voor fractie 3 werd berekend:

8,34 % waterstof; 61,48 % koolstof; 30,28 % zuurstof.

Gevonden was:

8,12 % waterstof; 61,43 % koolstof; 30,45 % zuurstof.

Van fractie 4 gaf 0,1380 grm. bij splitsing met zuur 0,0842 grm. sapogenine = 61 %.

Deze sapogenine was slechts weinig gekleurd. Ze werd door koken in alcoholische oplossing met dierlijke kool geheel ontkleurd.

¹⁾ Dit is de samenstelling van de oorspronkelijke fractie 1. Fractie 1, voor de splitsing gebruikt, is daarmede niet volkomen identisch (blz. 51), zoodat de samenstelling wel iets kan afwijken.

Ze smolt bij 297° (ongecorrigeerd) tot een zwak geelgekleurde vloeistof. Eenige graden beneden deze temperatuur begon ze reeds samen te pakken.

INWERKING VAN ALKALI OP DE SAPONINE.

Door mij werd gevonden, dat niet-haemolytische saponine door inwerking van alkali haemolytisch wordt.

De proeven, hierop betrekking hebbende, werden op de volgende wijze genomen. Een hoeveelheid niet-haemolytische saponine werd opgelost in halfnormaal natronloog; de oplossing werd bij gewone temperatuur c. 18 uur weggezet. Daarna werd met verdund zwavelzuur zoo goed mogelijk geneutraliseerd. Vervolgens werd de saponine met magnesiumsulfaat uitgezouten; het praecipitaat werd weer opgelost in water en nog eens met magnesiumsulfaat neergeslagen.

Deze praecipitaties dienden om een, mogelijk aanwezige, geringe overmaat van zuur of alkali weg te nemen. Tevens werd hierdoor de suiker, die bij de altijd optredende, gedeeltelijke splitsing ¹⁾ vrijkomt, weggenomen.

Uit het neerslag werd door behandeling met alcohol de saponine nagenoeg vrij van magnesiumsulfaat verkregen. Het neerslag werd daartoe uitgetrokken met spiritus; het achterblijvende magnesiumsulfaat werd opgelost in water en met alcohol neergeslagen; de spiritueuze filtraten werden bij lage temperatuur tot droog uitgedampt; de droogrest werd onder verwarming in een voldoende hoeveelheid absoluten alcohol opgenomen; bij bekoeling scheidde zich het magnesiumsulfaat af, dat na bezinking werd afgefiltreerd; het filtraat werd uitgedampt.

De aldus afgescheiden saponine was sterk haemolytisch. Bij een contrôleproef, op de zelfde wijze genomen, maar

¹⁾ De saponine, met natronloog behandeld, gaf met FEHLINGS proefvocht sterker reductie, dan een gelijke hoeveelheid onveranderde saponine.

waarbij dadelijk na de toevoeging van alkali werd geneutraliseerd, was de afgescheiden saponine niet-haemolytisch.

Deze proeven werden met de niet-haemolytische fracties 1 g (blz. 39), 2 en 3 (blz. 21) herhaald.

Deze fracties werden opgelost in normaal natronloog; deze oplossingen bleven onder dezelfde omstandigheden c. 18 uur staan; daarna werden de saponinen afgescheiden als boven is aangegeven.

Het haemolytisch vermogen van deze saponinen werd bepaald tegenover éézelfde mengsel 1:100 van geklopt runderbloed en keukenzoutoplossing van 0,8 %.

Na 24 uur werd nagegaan, in hoeverre door saponine-oplossingen van verschillende concentratie het bloedmengsel was ontleed.

Bij fractie 1 g gaf de oplossing 1:10.000 (10.000 volumes zoutoplossing bevatten dus 100 gewichtsdeelen bloed en 1 gewichtsdeel saponine) geheele ontleding, de oplossingen 1:12.500 en 1:16.600 gedeeltelijke, de oplossing 1:25.000 een spoor, de oplossing 1:50.000 geen ontleding.

Bij gedeeltelijke ontleding zijn de onopgeloste bloedlichaampjes bezonken, terwijl de bovenstaande oplossing gekleurd is.

Bij fractie 2 gaf de oplossing 1:6700 geheele ontleding van het bloedmengsel, de oplossing 1:10.000 gedeeltelijke, de oplossing 1:20.000 geen ontleding.

Bij fractie 3 gaf de oplossing 1:2500 geheele, de oplossing 1:5000 geringe, de oplossing 1:6250 geen ontleding.

Het bestanddeel, dat dit verschijnsel veroorzaakt, komt dus voornamelijk in de meest linksdraaiende fractie voor,

Nader onderzoek van de inwerking van alkali bij gewone temperatuur.

Om het wezen van deze verandering eenigszins nader te onderzoeken, werd nu 2 gram van de saponine (fractie 1) opgelost in $\frac{1}{2}$ normaal natronloog. Na 24 uur werd de oplossing met verdund zwavelzuur geneutraliseerd. Door

oplossen van 32 gram magnesiumsulfaat in de vloeistof, die 40 gram woog, werd de saponine neergeslagen. Het praecipitaat werd afgezogen.

Het filtraat bevat de afgesplitste suiker. Om na te gaan of hier een enkelvoudige, dan wel een samengestelde suiker was afgesplitst, werden de volgende proeven genomen.

Een proefje van het filtraat werd met twee volumes zoutzuur van 12,5 % gekookt; de oplossing werd niet troebel. Er was dus geen saponine aanwezig.

Bij een gedeelte van het filtraat werd $\frac{1}{5}$ volume sterk zoutzuur gevoegd. Het mengsel werd in een kolfje met opzetbuis een uur in een kokend waterbad verhit. Daarna werd het afgekoeld en met water op het oorspronkelijke gewicht teruggebracht.

Een ander deel van het filtraat werd met $\frac{1}{5}$ volume water verdund.

Het draaiingsvermogen van het zure mengsel bij 20° in een 2 d.M. buis was $+ 0,15^{\circ}$, dat van het neutrale $- 0,20^{\circ}$. Dit verschil maakt het waarschijnlijk, dat in het filtraat een samengestelde suiker voorkomt.

Ook bij verhitting van het filtraat met meer verdund zuur had inversie plaats. Nadat het een uur in een kokend waterbad met $\frac{1}{5}$ volume zwavelzuur van 2,5 % was verhit, was het draaiingsvermogen in een 2 d.M. buis $+ 0,03^{\circ}$.

De afgefiltreerde saponine werd eenige malen met een verzadigde oplossing van magnesiumsulfaat nagewasschen, in 40 c.c. water opgelost en weer met magnesiumsulfaat uitgezouten.

Dit filtraat had nauwelijks eenig draaiingsvermogen, ook niet, wanneer het met $\frac{1}{5}$ volume sterk zoutzuur was verhit; de vrije suiker was dus verwijderd.

Door behandeling met alcohol werd uit het praecipitaat de saponine, nagenoeg vrij van magnesiumsulfaat, teruggewonnen.

Deze saponine kon door fractionnaire praecipitatie uit

alcohol met aether in verschillend haemolytische gedeelten worden gesplitst.

Ze werd daartoe opgelost in 100 volumes absoluten alcohol en met 400 volumes aether neergeslagen.

Het neerslag (P₁) werd afgefiltreerd en in een vacuum-exsiccator gedroogd.

Uit het filtraat werd door afdestilleeren en verdampen van de oplosmiddelen een stof (F₁) afgescheiden.

Het praecipitaat (P₁) werd opnieuw uit 100 volumes alcohol met 400 volumes aether neergeslagen. Hierbij werd verkregen een praecipitaat (P₂), terwijl uit het filtraat een stof (F₂) werd afgescheiden.

De tweemaal met aether gepraecipiteerde saponine (P₂) was in water oplosbaar. Met loodazijn gaf deze oplossing geen neerslag. Deze saponine was slechts zwak haemolytisch. Met een oplossing 1 : 500 was het bloedmengsel na 24 uur geheel ontleed. Met een oplossing 1 : 1000 trad geen ontleding in.

De stof (F₂) loste in water op tot een zwak troebele vloeistof. In deze oplossing ontstond bij verwarming met loodazijn een neerslag. Het haemolytisch vermogen was veel sterker, dan dat van (P₂). Met een oplossing 1 : 25.000 was in 24 uur het bloedmengsel geheel ontleed. Met een oplossing 1 : 50.000 trad geen ontleding in.

De stof (F₁), na de eerste praecipitatie uit het filtraat verkregen, was moeilijk in water oplosbaar, gemakkelijk in alcohol. Uit de alcoholische oplossing werd ze door water geleiachtig neergeslagen. Werd aan de alcoholische oplossing een weinig alkali toegevoegd en dan water, dan bleef de oplossing helder.

Om deze stof te bevrijden van in water oplosbare saponine, werd ze opgelost in alcohol en door uitstorting in water gepraecipiteerd. Het neerslag werd afgefiltreerd, met water nagewasschen en gedroogd.

Ofschoon het zelf moeilijk in water oplosbaar was, kon het met behulp van niet-haemolytische saponine worden op-

gelost. Gelijke deelen van niet-haemolytische saponine en van de te onderzoeken stof werden in alcohol opgelost; de oplossing werd tot droog uitgedampt. Dit mengsel loste in water op tot een opalesceerende vloeistof.

Door een oplossing 1 : 100.000 (berekend op de gereinigde stof (F₁)) werden de bloedlichaampjes in een bloedmengsel 1 : 100 in 24 uur geheel ontleed, door een oplossing 1 : 125.000 gedeeltelijk, door een oplossing 1 : 160.000 een spoor, door een oplossing 1 : 250.000 niet.

Deze stof (F₁) heeft glycosideachtige natuur: bij koken met zuur wordt suiker afgesplitst.

Werd bij een geconcentreerde oplossing in alcohol overmaat van normaal natronloog gevoegd, dan ontstond een neerslag.

Uit de niet-haemolytische saponine ontstaat dus bij de inwerking van alkali, waarschijnlijk door afsplitsing van suiker, een haemolytische stof, die bij praecipitatie uit alcohol met aether in oplossing blijft.

Door herhaalde praecipitatie uit alcohol met aether verliest de saponine (P₂) geheel haar haemolytisch vermogen. Na de zesde praecipitatie was de saponine (P₆) 1 : 100 niet meer haemolytisch.

Opmerkelijk is, dat de stof uit het filtraat (F₆) nog tamelijk sterk haemolytisch was: Na 24 uur was met de oplossing 1 : 3300 nog volledige haemolyse ingetreden, bij 1 : 5000 gedeeltelijke, bij 1 : 10.000 geen haemolyse. Waarschijnlijk is het, dat bij de ontleding, die alcohol-aethermengsels altijd veroorzaken, ook haemolytische stof optreedt.

De zesmaal gepraecipiteerde saponine (P₆) werd door inwerking van normaal natronloog gedurende 24 uur ook weer haemolytisch: Een oplossing 1 : 5000 gaf grootendeels haemolyse; een oplossing 1 : 8300 gedeeltelijke haemolyse; een oplossing 1 : 25.000 geen haemolyse.

Inwerking van alkali bij verwarming.

Door inwerking van alkali op de saponine (fractie 1) bij

gewone temperatuur is het moeilijk volledige omzetting te verkrijgen; daarom werd getracht dit door verwarming te bereiken.

Een hoeveelheid saponine (fractie 1) werd in een kokend waterbad c. 1½ uur met normaal natronloog verwarmd.

Hierbij werd een neerslag afgescheiden. De oplossing ¹⁾ werd donker gekleurd, waarschijnlijk door inwerking van het alkali op de vrijkomende suiker. Het praecipitaat werd afgezogen en met kleine hoeveelheden normaal natronloog afgewasschen, totdat het aflopende vocht kleurloos was.

Het praecipitaat was wit, zijdeachtig glanzend en bleek te bestaan uit dunne, ruitvormige kristalplaatjes, die geen duidelijke polarisatie vertoonden.

Het werd opgelost in water. De oplossing werd met zoutzuur zwak zuur gemaakt. Hierbij werd een geleachtige stof afgescheiden, die werd afgefiltreerd.

Ze kon niet goed met water worden uitgewasschen, daar ze, wanneer het chloornatrium grootendeels was verwijderd, zelf in oplossing ging.

Daarom werd eerst met chloornatriumoplossing uitgewasschen, tot het filtraat, na uitdamping tot een kleine rest, niet meer zuur reageerde; vervolgens werd het neerslag gedroogd en fijngewreven. Deze, veel keukenzout bevattende, stof werd opgenomen in spiritus van 25 0/0. Het chloornatrium loste hierbij op; de stof werd in compacte vlokken afgescheiden. Ze werd afgefiltreerd en uitgewasschen met spiritus van 25 0/0, tot het filtraat geen chloorreactie meer vertoonde. Spiritus van 25 0/0 lost de stof moeilijker op dan water.

De op deze wijze van chloornatrium en zuur bevrijde stof (1) werd gedroogd en opgenomen in alcohol; de oplossing werd gefiltreerd en tot droog uitgedampt.

Van deze droogrest werd een proefje met behulp van niet-haemolytische saponine in keukenzoutoplossing van 0,8 0/0 opgelost en op het haemolytisch vermogen onderzocht.

¹⁾ De stoffen, die bij de verhitting der saponine met normaal natronloog in oplossing blijven, zijn niet onderzocht.

Bij een oplossing 1:150.000 was na 24 uur volkomen haemolyse ingetreden; bij een oplossing 1:200.000 grootendeels, bij een oplossing 1:250.000 een weinig haemolyse.

Het haemolytisch vermogen van deze stof is dus belangrijk sterker, dan dat van de in water moeilijke oplosbare stof (F 1), uit de saponine, na inwerking van alkali bij gewone temperatuur, door fractionneeren verkregen. Deze stof (F 1) bevat dus wellicht nog een ander, minder haemolytisch, splitsingsproduct.

Om deze *haemolytische stof* eenigszins nader te onderzoeken, werd een grootere hoeveelheid afgescheiden.

Bij gebrek aan saponine (fractie 1) werd 10 gram. ruwe saponine (blz. 16) gebruikt; deze werd eerst van de grootste hoeveelheid donkergekleurde stoffen bevrijd, door schudden van de alcoholische oplossing met magnesiumhydroxyde, en daarna eenigszins verder gezuiverd, door praecipiteeren uit verdunde alcoholische oplossing met het viervoudige volume aether.

Bij verwarmen met normaal natronloog ontstond ook hier een praecipitaat, dat echter een weinig bruin gekleurd was en niet fraai kristallijn. Het werd afgezogen en uitgewasschen met normaal natronloog.

Het neerslag werd nu opgelost in water; de oplossing werd gefiltreerd, waarbij een weinig bruine stof verwijderd werd. Uit het verwarmde filtraat werd de haemolytische stof weer neergeslagen door een voldoende hoeveelheid sterke natronloog. Het aldus verkregen, volkomen witte praecipitaat werd afgezogen. Daarna werd het opgenomen in water. Door zoutzuur werd de haemolytische stof afgescheiden. Deze werd uitgewasschen en verder behandeld, zooals dit bij de stof (1) uit fractie 1 is beschreven. De opbrengst wasc. 0,900 gram.

Deze stof (2) was minstens even sterk haemolytisch als de stof (1). Een oplossing 1:160.000 ontleedde een bloedmengsel 1:100 in 24 uur volkomen, een oplossing 1:250.000 gedeeltelijk.

Van deze stof (2) werd het *draaiingsvermogen* bepaald in absoluut-alcoholische oplossing in een 2 d.M. buis.

Een oplossing, bevattende op 10 c.c. 0,253 gram, gaf een draaiing van $+ 0,10^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,253} \times + 0,10^\circ = + 2,0^\circ.$$

Een hoeveelheid van de stof (2) werd nu in het vijfvoudige volume alcohol opgelost. Door toevoeging van het honderdvoudige volume aether werd een gedeelte (ongeveer de helft) gepraecipiteerd. Van dit praecipitaat (3) werd ook het draaiingsvermogen bepaald.

Een oplossing, bevattende op 10 c.c. 0,239 gram, gaf een draaiing van $+ 0,10^\circ$.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,239} \times + 0,10^\circ = + 2,1^\circ.$$

De bij de stoffen (2) en (3) verkregen uitkomsten stemmen binnen de grenzen van de gevoeligheid van den polarimeter overeen.

Als bijmengsel van de haemolytische stof zou kunnen voorkomen sapogenine, waarvan $[\alpha]_D = + 65^\circ$. Sapogenine wordt uit alcohol met aether niet of tenminste zeer moeilijk gepraecipiteerd. Bij aanwezigheid van een eenigszins belangrijke hoeveelheid daarvan, zouden de stoffen (2) en (3) niet de zelfde draaiing hebben. Overigens biedt de overeenstemming in de draaiing weinig waarborg voor de zuiverheid.

Van de haemolytische stof kon een *kristallijne kaliumverbinding* bereid worden, door ze op te lossen in alcohol, aan deze oplossing normaal kaliloog toe te voegen en dit mengsel voorzichtig uit te dampen ter verwijdering van den alcohol. Er werden wetsteenvormige, rechthoekige plaatjes afgescheiden, grootendeels tot kristalwratten vereenigd.

De natriumverbinding der haemolytische stof, op de zelfde wijze afgescheiden, was grootendeels amorf.

De haemolytische stof wordt door koken met zuur in sapogenine en suiker gesplitst.

Voor de bepaling van de *hoeveelheid der splitsingsproducten* werd het glycoside 6 uur met zwavelzuur van 4 % in een kokend waterbad verhit.

Om de haemolytische stof in fijn verdeelden toestand te verkrijgen, werd ze opgelost in weinig alcohol; deze oplossing werd zwak alkalisch gemaakt; daarna werd ze met water verdund; vervolgens werd zooveel zwavelzuur toegevoegd, dat het gehalte 4 % bedroeg. De haemolytische stof werd hierdoor fijn verdeeld neergeslagen.

Na de splitsing werd de sapogenine afgefiltreerd op een gewogen filter, uitgewasschen met water en bij 110° tot constant gewicht gedroogd.

Bij 0,2626 grm. stof (2) werd verkregen 0,1632 grm. sapogenine = 62 %.

Aan het filtraat werd zooveel natronloog toegevoegd, dat de reactie nog slechts een spoor zuur was. Daarna werd dit gedeeltelijk uitgedampt en met water tot 55 c.c. gebracht. Deze oplossing werd op suiker getitreerd volgens de methode LEHMANN-SCHOORL (l. c. op blz. 52).

Voor 25 c.c. suikerhoudende vloeistof werd bij twee bepalingen 13,95 c.c. en 14,00 c.c. $\frac{1}{10}$ normaal thiosulfaat minder gebruikt, dan voor de instelling van het FEHLINGS proefvocht; gemiddeld dus 13,97 c.c. Dit komt overeen met 0,0457 grm. suiker, berekend als glucose, in 25 c.c. oplossing, dus met 0,1005 grm. in 55 c.c. = 38,2 %.

Bij de splitsing der haemolytische stof (3), (uit de stof (2) verkregen door praecipitatie uit alcohol met aether) gaf 0,2194 grm. 0,1337 grm. sapogenine = 60,9 %.

Dat bij de stof (2) een grootere hoeveelheid sapogenine werd verkregen, dan bij stof (3), moet worden toegeschreven aan een bijmengsel, wellicht een wasachtige stof.

Om de sapogenine uit stof (2) daarvan te bevrijden, werd ze opgelost in alcohol. Aan deze oplossing werd veel aether toegevoegd. De alcoholisch-aetherische oplossing werd met verdunde natronloog uitgeschud, welke de sapogenine opnam.

De aetherische laag liet bij verdamping een restje achter, waarvan de oplossing in alcohol, alkalisch gemaakt, en met water verdund, sterk troebel werd.

De waterige alkalische oplossing der sapogenine werd nog

eens met aether uitgeschud. Het verdampingsrestje van de aether was nu in verdunde alkali oplosbaar.

Bij de sapogenine uit stof (3) verkreeg ik, bij behandeling als bij die uit stof (2), een aetherrestje, dat met slechts zwakke opalescentie in alkalisch water oploste.

Aan de alkalische oplossingen van de *sapogeninen*, op deze wijze gereinigd, werd nu weer zuur toegevoegd, totdat de concentratie 4% bedroeg. De mengsels werden nog 6 uur in een kokend waterbad verhit om de laatste sporen suiker af te splitsen. Daarna werden de sapogeninen afgefiltreerd, met water uitgewassen en gedroogd.

De beide sapogeninen waren wel identisch; beide smolten bij 297° (ongecorrigeerd) tot een zwak geel gekleurde vloeistof. Eenige graden beneden deze temperatuur begonnen ze echter al samen te pakken.

Van de sapogenine kon een kristallijne kaliumverbinding worden verkregen, door ze op te lossen in alcohol, aan deze oplossing kaliloog toe te voegen en het mengsel gedeeltelijk uit te dampen ter verwijdering van den alcohol.

Er werden recht uitdoovende naalden afgescheiden. Deze werden afgezogen en met normaal kaliloog nagewassen. Daarna werden ze met zoutzuur ontleed. De aldus afgescheiden sapogenine smolt bij dezelfde temperatuur als de sapogenine, waarvan was uitgegaan.

Het *draaiingsvermogen* van de sapogenine werd bepaald in een 2 d.M. buis in absoluten alcohol.

Een oplossing, bevattende in 10 c.c. 0,1880 grm., gaf een draaiing van + 2,45°.

$$[\alpha]_D = \frac{10}{2 \times 0,1180} \times + 2,45^\circ = + 65^\circ.$$

De sapogenine uit de haemolytische stof komt, wat draaiing betreft (65°), tamelijk wel overeen met die, afgescheiden uit fractie 1 van de gele saponine (66°, zie blz. 55). De smeltpunten zijn eenigszins verschillend.

Een kleine hoeveelheid sapogenine uit fractie 1 werd gereinigd, als die uit de haemolytische stof, n.l. door ze op

te lossen in alcohol, aether toe te voegen en vervolgens wat natronloog en dit mengsel uit te schudden met water. De sapogenine gaat hierbij in de waterige laag, niet zure bijmengsels kunnen in de aether achterblijven.

De sapogenine, uit de waterige laag door zuur afgescheiden, was een weinig geel getint en smolt bij 292° tot een geelbruine vloeistof. Het smeltpunt komt dus dicht bij dat van de sapogenine uit de haemolytische stof. Waarschijnlijk zijn de sapogeninen identisch; die uit fractie 1 echter een weinig verontreinigd.

Voor het *qualitatief onderzoek van de suiker*, werd deze afgescheiden door splitsing van de haemolytische stof met zwavelzuur, affiltreeren van de sapogenine, neutraliseeren van het filtraat met bariumcarbonaat en uitdampen na filtratie.

De oplossing van de suiker 1 : 50 gaf, wanneer er phenylhydrazinehydrochloride en natriumacetaat in werden opgelost, zwakke geelkleuring en geringe opalescentie. Deze laatste verdween bij verwarming weer.

Bij verhitting in een kokend waterbad ontstond een osazon, dat eerst goed werd afgescheiden bij bekoeling van de oplossing. Dit osazon bestond bijna geheel uit de zeshoekige plaatjes, die ook in het osazon van de suiker van fractie 1 en 3 (blz. 50) voorkomen en toegeschreven werden aan het osazon van een methylpentose. De hoeken waren eenigszins afgerond. Vele lagen los, andere tot rosetten vereenigd. Van het centrum van enkele rosetten straalden ook naaldbundels uit, misschien van glucosazon; het typisch beeld van glucosazon, zooals dit bij de fracties 1, 3 en 4 voorkwam, trad hier niet op.

De suiker gaf de pentosereactie van WHEELER en TOLLENS (met phloroglucine en zoutzuur).

Ook gaf ze de methylpentosereactie van OSHIMA en TOLLENS; werd de suiker met zoutzuur van 12,5 % gedestilleerd, dan gaf het destillaat met phloroglucine en zoutzuur eerst geelbruinkleuring (met den absorptieband van methyl-

furfurol-phloroglucide); later werd de oplossing donker door furfurol-phloroglucide. Het destillaat gaf ook de furfurolreactie met anilineacetaat.

Het destillaat gaf ook de reactie van ROSENTHALER ¹⁾. Bij zwakke verwarming met aceton en sterk zoutzuur werd de kleur blauwachtig-rood.

Voor het spectroscopie vertoonde de vloeistof een absorptieband, bij de D-lijn (het maximum op 10,2 van de schaal). Deze band is kenmerkend voor methyلفurfurol.

Furfurol geeft ook een roode oplossing met een absorptieband waarvan het maximum op 10,7. Deze trad hier niet op.

Voor het onderzoek op hexosen werd de suiker gebruikt uit 250 mgr. haemolytische stof, dus ongeveer 100 mgr. suiker. Het baryt werd hieruit verwijderd door verwarmen der oplossing met 10 mgr. natriumsulfaat en affiltreeren van het gevormde bariumsulfaat.

De zoo verkregen neutrale oplossing werd tot droog uitgedampt en opgenomen in 1 c.c. uitgekookt water. In deze oplossing werd 100 mgr. gist door schudden verdeeld. De gisting had plaats in een klein gistbuisje bij 34° gedurende 18 uur. Hierbij werd een kleine hoeveelheid koolzuur ontwikkeld.

Bij contrôleproeven gaf de gist zonder suiker slechts een gasbelletje. Ook rhamnose en xylose gaven geen koolzuurontwikkeling. Een procent natriumsulfaat stoort de gisting niet.

Bij de gisting gaf 10 mgr. glucose, ook naast 80 mgr. rhamnose of xylose, krachtige gasontwikkeling. De hoeveelheid gas, c. 2,5 c.c., was wel driemaal zoo groot als bij de onderzochte suiker.

In de suiker uit de haemolytische stof is dus wel een hexose aanwezig, maar in zoo geringe hoeveelheid, dat men het gehalte aan hexose eerder aan een bijmengsel zou toeschrijven, dan aan de hoofdstof.

Daar de haemolytische stof meer sapogenine bevat en

¹⁾ Zeitschrift für analyt. Chemie Bd. 48 (1909) p. 165.

minder suiker, dan de saponine, waaruit ze is bereid, is ze hoogst waarschijnlijk een splitsingsproduct van een van de saponineachtige stoffen, en daaruit ontstaan door afsplitsing van een deel van de suiker.

Ook gedeeltelijke splitsing met zuur maakt de saponine haemolytisch. Niet-haemolytische saponine werd met verdund zwavelzuur verwarmd, tot de oplossing juist troebel werd. De saponine, vervolgens uit de oplossing afgescheiden, was haemolytisch geworden (c. 1 : 10.000).

De sapogenine, door volledige splitsing met zuur uit de saponine verkregen, was niet-haemolytisch.

FRACTIE 4.

Omdat de resultaten van het onderzoek van fractie 4 in het voorgaande nog al verspreid voorkomen, vat ik ze hier samen.

Deze stof was verkregen bij het fractionneeren uit alcohol met aether van de gele saponine (blz. 20). Na de afscheiding van de fracties 1, 2 en 3 bleef een alcoh. aetherische oplossing, die met water werd geschud. In de aether bleven de wasachtige stoffen. Uit de waterige laag werd na gedeeltelijk uitdampen, waardoor de alcohol werd verwijderd, een moeilijk in water oplosbare stof (fractie 4) afgescheiden.

Fractie 4 is in water, aether en chloroform moeilijk oplosbaar, goed in absoluten alcohol, verdunden spiritus en ijsazijn. Uit de oplossing in ijsazijn, tot troebel worden met water verdund, werden aan de lucht kristallen afgescheiden.

Het soortelijk draaiingsvermogen (in spiritus van 70 %) was $+ 37^{\circ}$.

Bij splitsing met zuur gaf ze 61 % sapogenine, die bij 297° (ongecorrigeerd) smolt.

De afgesplitste suiker bevat waarschijnlijk glucose en arabinose; methylpentose kon er niet in worden aangetoond.

Met behulp van niet-haemolytische saponine opgelost, was ze zwak haemolytisch (1 : 250).

Het smeltpunt van de sapogenine is hetzelfde, als dat van de sapogenine uit de haemolytische stof, in het voorgaande hoofdstuk besproken. Ook in andere opzichten stemmen de sapogeninen overeen:

In oplossingen van 1% in methylalcohol geven ze met lood-acetaat een overvloedig neerslag, in overmaat niet oploosend. In oplossingen in methylalcohol geeft loodazijn, met vier volumes methylalcohol verdund, een overvloedig praecipitaat, dat in overmaat niet oplost. Gebruikt men bij deze reactie aethylalcohol in plaats van methylalcohol, dan verkrijgt men ook een neerslag, maar dat in overmaat gemakkelijk oplost.

't Is dus niet onwaarschijnlijk, dat de haemolytische stof en fractie 4 (ook fractie 1) derivaten zijn van dezelfde sapogenine. (Het onderzoek van andere vergelijkbare eigenschappen, als draaiingsvermogen en elementaire samenstelling, moest wegens de geringe hoeveelheid stof achterwege blijven).

Het gehalte aan sapogenine is bij beide stoffen niet veel verschillend (c. 61 %), maar de suikers zijn niet aan elkaar gelijk; de haemolytische stof bevat een belangrijke hoeveelheid methylpentose, fractie 4 bevat daarentegen geen of slechts zeer weinig methylpentose; de suiker dezer fractie bestaat waarschijnlijk uit arabinose en glucose.

Fractie 4 is waarschijnlijk ook een splittingsproduct van de saponine. Bij behandeling van de saponine met alcohol-aether mengsels (vooral bij het afdestilleeren van deze oplosmiddelen) treden altijd ontledingen op (zie blz. 43), waarbij een stof ontstaat, die in water moeilijk oplosbaar is, in alcohol-aether mengsels echter gemakkelijker oplosbaar, dan de saponine, waaruit ze is ontstaan.

Nu is de zuivering en fractionneering van de gele saponine, waaruit de fracties 1 tot 4 verkregen zijn, een opeenvolging van alcohol-aether behandelingen geweest. De in water moeilijk oplosbare stof moet dus hierbij ook ontstaan zijn en terecht gekomen zijn in de fractie, die het gemakkelijkst in alcohol-aether mengsels oploste, dus in de rest, die achter bleef toen fractie 3 was afgescheiden. Deze rest loste, na

door aether van was enz. te zijn bevrijd, in water slechts gedeeltelijk op. De onopgeloste stof is fractie 4.

DE GROENE SAPONINE.

Deze was (blz. 21) uit de ruwe saponine afgescheiden door schudden der spiritueuze oplossing met magnesiumoxydehydraat.

Ze bevatte een stof, die magnesiumoxydehydraat sterk geel kleurde.

Met sterk zwavelzuur overgoten, loste ze op onder sterke geelbruin kleuring; deze ging na eenigen tijd in de purperkleur van de saponinereactie over.

Met ferrichloride gaf ze in verdunde waterige oplossing een bruingroene verkleuring. Deze wordt niet door chlorogeenzuur veroorzaakt; tenminste verkreeg ik niet de door GORTER (l. c. op blz. 10) aangegeven reactie op deze stof.

Met loodazijn in overmaat verwarmd, ontstond in de waterige oplossing een overvloedig geel neerslag. Uit het filtraat kon nog een belangrijke hoeveelheid weinig gekleurde, zwak haemolytische saponine worden afgescheiden, die met loodazijn nauwelijks een troebeling gaf, maar met één-basisch loodacetaat een overvloedig praecipitaat. Deze saponine komt dus wel overeen met de gele saponine (blz. 20).

De groene saponine was haemolytisch; in 15 minuten ontleedde ze, in een concentratie 1:6000, het bloedmengsel 1:100.

Ik heb niet getracht deze haemolytische stof te isoleeren, daar mij een methode ontbrak om dit te doen, zonder dat nieuwe haemolytische stof bij de bewerking kon worden gevormd. Ook is het waarschijnlijk, dat de haemolytische stof uit de groene saponine reeds gedeeltelijk bij de voorafgaande bewerking is gevormd. Zoo kan bij het uitdrogen der ruwe saponine, waaruit de groene werd verkregen, en die nog wat ammoniumsulfaat bevatte, het vrijkomende zwavelzuur (zie blz. 16) wel wat haemolytische stof hebben afgesplitst (blz. 69).

SAMENVATTING.

Uit de bladeren van *Trevesia sundaica* MIQ. werd volgens min of meer gebruikelijke, door mij naar eigen ondervinding eenigszins gewijzigde, methoden een nog onzuivere saponine afgescheiden (de ruwe saponine).

Hierbij werd o.a. gebruik gemaakt van de eigenschap dezer saponine, dat ze volkomen door ammoniumsulfaat (ook door magnesiumsulfaat) kon worden uitgezouten.

De ruwe saponine werd gereinigd volgens de magnesia-methode. In plaats van deze op de gebruikelijke wijze toe te passen, waarbij ontleding plaats vond, werd de saponine in spiritueuze oplossing met magnesiumoxydehydraat geschud; hierbij stond de saponine minder bloot aan de ontledende werking van de base. In de oplossing bleef een geelgekleurde saponine. Het magnesiumoxydehydraat trok tot zich, behalve een groot deel van de kleurstoffen, ook nog een deel van de saponine, in 't bijzonder dat met zure functie. Door ontleden met zuur en uitzouten met magnesiumsulfaat kon uit het magnesiumoxydehydraat een groen gekleurde saponine gewonnen worden. Uit de ruwe saponine werden dus twee fracties verkregen, de gele en de groene saponine. Terwijl de ruwe saponine haemolytisch was, was de gele dit nauwelijks meer, de groene daarentegen sterker dan de ruwe.

De groene saponine is verder weinig onderzocht.

De gele saponine is nog geenszins een enkelvoudige stof. Door een reeks van bewerkingen, waaronder de belangrijkste was, herhaald fractionnair praecipiteeren uit alcohol met aether, werden hieruit vier glycosideachtige, witte fracties verkregen, als fractie 1, 2, 3 en 4 onderscheiden. Fractie 1 werd het

gemakkelijkst uit alcohol met aether neergeslagen; dan volgen in de volgorde van hun nummers de andere.

Fractie 4, wellicht een splitsingsproduct, werd kristallijn verkregen.

De fracties 1, 2 en 3 waren amorf. Ze verschilden belangrijk in eigenschappen. 't Zijn mengsels, die ik niet in enkelvoudige stoffen heb kunnen ontleden. Fractionneering uit alcohol van fractie 1 (de hoofdmassa) leidde niet tot gelijkwaardige fracties, terwijl andere methoden van fractionneering geen betere uitkomsten beloofden.

Met zuren konden de fracties worden gesplitst in sapogenine en suiker. Onder de suikers van de fracties 1, 2 en 3 komt zoowel hexose, als pentose en methylpentose voor. Fractie 1 bevat belangrijk meer suiker dan fractie 3. De meeste sapogenine en dus wel de minste hoeveelheid suiker bevat fractie 4; in de suiker kon geen methylpentose worden aangetoond; ze bestaat wellicht uit glucose en arabinose.

Door inwerking van alkali ondergaat de niet-haemolytische fractie 1 van de gele saponine ook een splitsing, waarbij een gedeelte van de suiker (wellicht een samengestelde suiker) wordt afgesplitst. Deze splitsing leidt o. a. tot de vorming van eene nieuwe saponinestof met zeer sterk haemolytisch vermogen. De suiker, die in deze nieuwe saponine nog gebonden aan de sapogenine voorkomt, bestaat voor een groot deel uit methylpentose.

Dit ontledingsproces kan mogelijk een nieuw uitgangspunt vormen voor de studie der nog weinig bekende constitutie der saponinen.

STELLINGEN.

STELLINGEN.

I.

De scheiding van saponinen door middel van loodacetaat, volgens de methode van KOBERT (Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. Bd. 23 (1887) p. 240, dit proefschrift p. 3), mag niet, zonder nader onderzoek in elk bijzonder geval, als een volkomen scheiding worden beschouwd.

II.

De wijze, waarop BOORSMA (Meded. uit 's Lands Plantent. N^o. 52 (1902) p. 77; dit proefschrift p. 10) aantoonst, dat de bast van *Trevesia sundaica* MIQ. slechts één saponineachtig bestanddeel bevat, is niet overtuigend.

III.

Het is wenschelijk, sterk werkende galenische praeparaten in te stellen op een bepaald gehalte van het bestanddeel, dat in hoofdzaak de physiologische werkzaamheid bepaalt.

IV.

Voor de therapeutische waardebepaling van digitalisbladeren is de physiologische methode (op kikvorschen) te verkiezen boven een digitoxinebepaling. (Focke. Arch. d. Pharm. Bd. 241 (1903) p. 128 u. 669; Bd. 247 (1909) p. 545).

V.

Voor het verkrijgen van geconcentreerde uittreksels uit plantendeelen, verdient de uitpersmethode (systeem BRUNS) aanbeveling. (KROEBER. Pharm. Zentralh. Bd. 51 (1910) p. 41).

VI.

In 't algemeen is het wenschelijk, homoeopathische verdunningen vóór de aflevering versch te bereiden uit de oorspronkelijke geneesmiddelen, liefst met versch bereide verdunningsmiddelen.

VII.

De opvatting, voorkomende in CHWOLSON'S Lehrbuch der Physik Bd. 1 p. 534 u. 566, als zou de moleculaire drukking van de begrenzende laag zich in de vloeistof voortplanten, is onjuist, in zooverre dit betreft de constante K uit de formule van LAPLACE, $P = K + \frac{H}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$.

De moleculaire drukking binnen in een vloeistof met vlak oppervlak (K), wordt niet veroorzaakt door de begrenzende laag.

VIII.

Het is waarschijnlijk, dat de blauwzuurglicosiden in de planten fungeeren als stikstofreserve (TREUB. Ann. du Jard. Bot. de Buitenzorg, vol. 23 (1909) p. 97).

IX.

Het is waarschijnlijk, dat bij transversaal-heliotrope bladeren de beweging, onafhankelijk van de verlichting van den bladsteel, naar den gunstigsten stand ten opzichte van het licht, in verband staat met de eigenaardige verlichting van de protoplasmalaag aan den binnenkant van de epidermiscellen van den bovenkant der bladeren. (HABERLANDT. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 46 (1909) p. 377).

X.

Het zoogenaamde «vrije calciumhydroxyde» van de chloor-kalk komt waarschijnlijk (ten minste voor een belangrijk deel) niet als zoodanig daarin voor. (DITZ. Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 14 (1901) p. 3, 27, 50, 105; Bd. 20 (1907) p. 754).

XI.

Door het onderzoek van TIJMSTRA (Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 38 (1905) p. 1375.) is het verloop der reactie, bij de bereiding van salicylzuur door verhitting van natriumphenolaat met koolzuur, nog niet voldoende opgehelderd.

XII.

De onderzoeken van FEIST (Arch. d. Pharm. Bd. 246 (1908) p. 206, Bd. 247 (1909) p. 230 u. 542) bewijzen niet, dat d. benzaldehydecyaanhydrine optreedt als splitsingsproduct bij de splitsing van amygdaline door emulsine.

XIII.

De opvatting van BACH (Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 43 (1910) p. 366), dat metaalzouten slechts indirecten invloed zouden uitoefenen op de werking der oxygenase, wordt door zijn onderzoek niet voldoende gemotiveerd.

't Is waarschijnlijk, dat metaalzouten ook rechtstreekschen invloed daarop kunnen uitoefenen.





A