

Mitteilung aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie  
in Berlin-Dahlem

## Über Vorkommen von Saponinen im Tabak und über einen Begleitstoff

Von **Maria Kobel** und **Carl Neuberg**

(Eingegangen am 20. April 1935)

In früheren Arbeiten<sup>1)</sup> ist gezeigt, daß in allen Tabaksorten ein Uronsäurederivat weit verbreitet ist, und zwar in Form des Galakturonsäure liefernden Pektins. Aus ganz frisch gepflückten Tabakblättern, wo man nicht mit einer Zerlegung dieses hochmolekularen Kohlenhydrats durch Pektin weitabbauende Enzyme (Pektolasen) zu rechnen braucht, extrahierten wir mit Alkohol, der Pektinkörper niederschlägt, neue Substanzen. Eine Gruppe derselben gibt nach Hydrolyse Uronsäurereaktion. Als solche Uronsäurederivate kommen Glycoside im engeren Sinne und Saponine in Betracht.

Zieht man frisch gepflückte und zerkleinerte Tabakblätter nach Aufkochung, durch die jede Fermentwirkung unterbunden wird, mit Alkohol aus, so gehen bisher unbekanntes Verbindungen in Lösung. Dampft man diese Extrakte auf den 25. Teil ihres Volumens im Faust-Heimschen Verdunstungskasten ein, so scheiden sich neben öligen und harzigen Bestandteilen, die auf der Flüssigkeit schwimmen, an den Gefäßwänden allmählich Krystallkrusten ab. Diese enthalten ein Glycosid, dessen Vorkommen in Tabak man einer wichtigen Arbeit des japanischen Forschers Hasegawa<sup>2)</sup> bereits entnehmen kann. Der genannte

---

<sup>1)</sup> C. Neuberg u. M. Kobel, *Biochem. Ztschr.* **179**, 459 (1926); C. Neuberg u. B. Ottenstein, *Biochem. Ztschr.* **197**, 491 (1928); Th. Andreadis, *Biochem. Ztschr.* **211**, 378 (1929); C. Neuberg u. M. Scheuer, *Biochem. Ztschr.* **243**, 461 (1931).

<sup>2)</sup> H. Hasegawa, *Chem. Zentralbl.* **1932**, I, 3510.

Autor mißt diesem Körper eine besondere Bedeutung für den Farbumschlag bei, der bei der Vergärung und zum Teil auch beim Trocknen der Tabakblätter eintritt und in der bekannten Braun- oder Gelbbraunfärbung beruht. Er gründet seine Ansicht darauf, daß sich dieses Glycosid, das er als Rutin betrachtet, mit Kobaltpentamminchloridlösung dunkel färbt, wobei Nuancen auftreten, die er mit den im Verarbeitungsprozeß des Tabaks auftretenden Verfärbungen vergleicht. Nähere Angaben über Darstellung und Identifizierung dieses Glycosids macht Hasegawa nicht. Tatsächlich kann man Rutin, das sich übrigens auch in sehr vielen anderen Pflanzen vorfindet, aus den erwähnten Krystallen isolieren, die wir aus dem alkoholisch-wäßrigen Tabakextrakt erhielten. Wir konnten  $\frac{2}{3}$  ihres Gewichtes an reinem Rutin gewinnen, nachdem sie mit kaltem Wasser geschüttelt waren, in dem das Rutin unlöslich ist. Welche Substanzen das Rutin begleiten, läßt sich zur Zeit noch nicht sagen; zu ihrer Charakteristik kann nur angeführt werden, daß sie Nicotin enthalten, durch Säure hydrolysierbar sind und dann Fehlingsche Lösung reduzierende Flüssigkeiten ergeben. In letzteren befinden sich Uronsäuren und Zucker, die man auf Grund der Unlöslichkeit des Bariumuronats in Alkohol trennen kann. Ob unter diesen Substanzen auch die von Yamafuji<sup>1)</sup> beschriebenen Glycoside Tabacinin und Tabacilin zugegen sind, steht dahin.

Das Rutin ist ebenfalls in anderen Fraktionen vorhanden, die man aus dem Rückstand des mit Alkohol extrahierten Tabaks isolieren kann, wenn man ihn erneut mit verdünntem Alkohol auskocht. In diese Alkoholauszüge treten nun aber noch andere Substanzen über, deren nähere Charakterisierung uns gelungen ist. Es handelt sich um Körper aus der Gruppe der Saponine. Der Saponincharakter wurde durch das typische Hämolysevermögen für verschiedenartige Blutkörperchen festgestellt, auch konnte in vielen Fällen die charakteristische reversible Hemmung durch Cholesterin nachgewiesen werden. Daß es sich um Saponine handelt, geht ferner daraus hervor, daß man aus dem Saponin-Cholesterin-Aggregat Saponin zurückgewinnen kann.

---

<sup>1)</sup> K. Yamafuji, Chem. Zentralbl. 1932, II, 3105.

Der hämolytische Wirkungsgrad der abgeschiedenen Saponinpräparate ist, so weit unsere Untersuchungen reichen, Schwankungen unterworfen, da die Reinigung der Tabaksaponine Schwierigkeiten bereitet. Über das Verhalten der Saponine verschiedenen Reinheitsgrades werden Angaben im experimentellen Teil gemacht.

Hier sei nur auf die allgemeinere Bedeutung dieser Feststellung hingewiesen. Saponine kommen häufig im Pflanzenreich vor, so daß ihr Auftreten im Tabak nicht verwunderlich erscheint. Es wird aber zu den Aufgaben der weiteren Forschung gehören, festzustellen, ob die physiologisch wichtigen Saponine bei der sogenannten Tabakfermentation oder den ihr gleich zu setzenden Operationen erhalten bleiben oder zerstört werden.

Das vorhin erwähnte, nicht nur in frischen Tabakrohsäften, sondern auch in den Saponinfraktionen unverändert anwesende Rutin wurde in vergorenem Tabak bisher von uns nicht nachgewiesen.

Oparin<sup>1)</sup> hat darauf aufmerksam gemacht, daß Chlorogensäure ein weit verbreiteter Pflanzenbestandteil ist und bei den Oxydationsvorgängen in Vegetabilien eine beachtliche Rolle spielt<sup>2)</sup>; König und Dörr<sup>3)</sup> haben weiterhin mitgeteilt, daß diese Substanz auch im Tabak vorkommt. Es ist ihnen die Isolierung einer kleinen Menge gelungen, im übrigen stützen sie ihre Angaben im wesentlichen auf eine für Chlorogensäure als charakteristisch betrachtete Farbenreaktion. Diese tritt nun, wie wir gefunden haben, mit Rutin in ähnlicher Weise ein. Darüber soll gelegentlich berichtet werden. —

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung von Saponin diente selbstgezogener frischer Zigarettenabak (*Basma seris*).

Je 20 kg Anfang August 1934 frisch geerntete und zerkleinerte Tabakblätter wurden mit 2 $\frac{1}{2}$  Liter Wasser  $\frac{1}{4}$  Stunde im Dampfbad gekocht und dann mit 45 Liter siedendem 99-prozent. Alkohol übergossen. Nach einigen Tagen wurde abgesaugt, mit 66-prozent. Alkohol nachgewaschen und die Tabakmasse an der Luft getrocknet. Die Menge des so erhaltenen Trockenpräparats machte 11—12 $\frac{0}{10}$  vom Frischgewicht

<sup>1)</sup> A. Oparin, *Biochem. Ztschr.* **124**, 90 (1921).

<sup>2)</sup> A. Oparin, *Biochem. Ztschr.* **182**, 155 (1927).

<sup>3)</sup> P. König u. W. Dörr, *Biochem. Ztschr.* **263**, 295 (1933).

der Blätter aus. Portionen von je 80 g dieses Tabakpulvers wurden zur Entfernung der Hauptmenge des Chlorophylls und sonstiger ätherlöslicher Substanzen etwa 1 Woche in Soxhlet-Apparaten mit Äther extrahiert und dann im Exsiccator über Paraffin, Chlorcalcium und Phosphorpentoxyd getrocknet. Die Quantität der durch die Ätherextraktion herausgelösten Stoffe betrug 8,5—9,5% des verwendeten Tabak-trockenmaterials. Das auf die angegebene Weise erst mit Alkohol und dann mit Äther behandelte Tabakpulver diente zur Isolierung des Tabaksaponins.

Die Aufarbeitung erfolgte auf dreierlei Art:

#### A

Je 240 g mit Äther ausgezogenen Tabakpulvers wurden mit je 6 Liter 70-prozent. Alkohol 2 Stunden unter Rückfluß gekocht. Sodann wurde abgesaugt, das alkoholische Filtrat über Nacht im Eisschrank aufbewahrt und durch Zentrifugieren von einem geringen Niederschlag befreit. Das alkoholische Zentrifugat wurde darauf im Faust-Heimschen Verdunstungskasten auf etwa 200 ccm eingeengt, durch Nachspülen der Schalen auf 240 ccm gebracht und durch Eingießen in 4,8 Liter 99-prozent. Alkohol gefällt. Am nächsten Tage wurde der Niederschlag, der als  $J_1$  bezeichnet sei, abzentrifugiert, mit Alkohol gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Das alkoholische Zentrifugat wurde mit dem Waschalkohol vereinigt und im Faust-Heimschen Verdunstungskasten auf 110 ccm gebracht. Durch Eingießen dieser infolge Anwesenheit von Chlorophyllresten etwas schmierigen Flüssigkeit in 2,2 Liter 99-prozent. Alkohol wurde eine 2. Fraktion —  $J_2$  — erhalten, die wiederum durch Zentrifugieren abgetrennt und mit Alkohol gewaschen wurde.

Das alkoholische Zentrifugat von  $J_2$  wurde mit 3 Liter absolutem Äther versetzt, wodurch eine flockige Fällung erzeugt wurde. Diese 3. Fraktion —  $J_3$  — wurde nach Stehen über Nacht auf einer Schottschen Glasfilternutsche 25 G 4 abgesaugt, mit Äther gewaschen und sofort im Exsiccator getrocknet. Da diese wie auch die weiteren durch Fällung mit Äther erhaltenen Niederschläge sehr hygroskopisch sind, muß man streng darauf achten, daß die Substanz beim Absaugen stets mit Äther überschichtet bleibt.

Das Filtrat von  $J_3$  wurde wiederum im Faust-Heimischen Verdampfungsapparat auf etwa 15 ccm eingengt, mit 450 ccm Alkohol aufgenommen und mit 900 ccm Äther versetzt. Dabei entstand eine schmierende, sich am Boden absetzende Fällung. Am nächsten Tag wurde die alkoholisch-ätherische Lösung abgegossen und der halb feste Niederschlag mit absolutem Äther verrührt. Nach einigem Stehen im Eisschrank war dann eine Abtrennung dieser Substanz —  $J_4$  — durch Absaugen durch eine Schottische Glasfilternutsche möglich. Die abgegossene alkoholisch-ätherische Lösung wurde mit dem ätherischen Filtrat von  $J_4$  vereint, mit Äther auf 5 Liter gebracht und mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt. Dabei setzte sich allmählich am Boden ein fester Niederschlag —  $J_5$  — ab, der sich nach Abgießen der alkoholisch-ätherischen Lösung und Verreiben mit frischem Äther auf einer Glasfilternutsche gut absaugen ließ. Die Mutterlauge von  $J_5$  wurde erneut im Verdunstungskasten zur Trockne gebracht, in 40 ccm Alkohol gelöst und mit 600 ccm Äther versetzt. Der anfangs sehr feine Niederschlag —  $J_6$  — setzte sich bei 2-tägigem Stehen im Eisschrank allmählich in filtrierbarer Form ab.

Die verschiedenen Fraktionen wurden in m/15-Phosphatlösung von  $p_H$  7,2—7,3, die 0,9% NaCl enthielt, gelöst und in 1- bzw. 2-prozent. Lösung auf ihre hämolytische Wirkung gegenüber einer 1-prozent. Suspension von gewaschenen Pferdeblutkörperchen in der gleichen Phosphat-NaCl-Lösung geprüft. Der hämolytische Index wurde nach der Tabelle von Dafert<sup>1)</sup> berechnet.

Die bei verschiedenen, in der beschriebenen Weise ausgeführten Versuchen erhaltenen Ausbeuten an den Fraktionen  $J_1$  bis  $J_6$  sowie die hämolytischen Indizes der einzelnen Präparate sind in der folgenden Tab. I zusammengestellt. Die Mengen der  $J_2$ -Fraktionen der Versuche 18 und 19 sind größer als bei den anderen Ansätzen; das ist darauf zurückzuführen, daß die Mutterlauge der  $J_1$ -Anteile in diesen Fällen auf 60 ccm eingengt und dann mit Wasser auf 110 ccm verdünnt wurden. Durch das starke Einengen sind Substanzen, ins-

---

<sup>1)</sup> L. Kofler, Die Saponine, S. 153, Springer, 1927.

besondere Rutin (vgl. S. 35), ausgefallen, die sich dann nicht mehr lösten und in diese Fraktionen mit eingingen.

Tabelle I

Versuch	13		15		16		18		19	
	g	Hämolyt. Index	g	Hämolyt. Index	g	Hämolyt. Index	g	Hämolyt. Index	g	Hämolyt. Index
$J_1$	8,8	0	9,0	0	8,6	0	8,9	0	8,5	0
$J_2$	1,5	200	0,9	800	1,0	670	1,8	etwa 100	2,0	etwa 100
$J_3$	5,8	etwa 100	6,2	250	6,2	250	5,6	„ 150	5,7	„ 150
$J_4$	4,5	„ 100	4,5	etwa 100	4,7	etwa 100	5,2	200	5,1	200
$J_5$	2,0	330	—	—	—	—	1,4	< 100	1,2	< 100
$J_6$	1,2	0	—	—	0,85	0	1,1	0	0,9	0

Die Präparate  $J_4$ ,  $J_5$  und  $J_6$  waren immer außerordentlich hygroskopisch, die  $J_5$ -Fraktionen aus den Versuchen 15 und 16,  $J_{15_5}$  und  $J_{16_5}$  sowie  $J_{15_6}$  schmierten beim Abnehmen von den Nutschen derart, daß keine genaue Wägung möglich war. Über ihre weitere Aufarbeitung vgl. S. 38.

Um zu stärker hämolytisch wirksamen Saponinpräparaten zu gelangen, wurden die Fraktionen  $J_1$ — $J_6$  weiter zerlegt.

17,2 g der vereinten, in 2-prozent. Lösung hämolytisch unwirksamen ersten Fraktionen der Versuche 13, 15 und 16,  $J_{13, 15, 16_1}$ , wurden mit 90 ccm Wasser verrührt, über Nacht im Eisschrank aufbewahrt und dann von dem unlöslichen Anteil abzentrifugiert, der 2-mal mit wenig Wasser auf der Zentrifuge ausgewaschen wurde. Nach Trocknen im Exsiccator betrug diese Fraktion  $J_{13, 15, 16_1a}$ : 1,70 g. Zentrifugat und Waschwasser, zusammen 130 ccm, wurden in 2,6 Liter 99-prozent. Alkohol eingegossen. Die dadurch erhaltene Fällung  $J_{13, 15, 16_1b}$  wog 13,42 g. Das Filtrat wurde im Faust-Heimschen Verdunstungskasten zum Sirup eingeeengt, mit 5 ccm Wasser verrührt und in 200 ccm 99-prozent. Alkohol eingegossen. Der Niederschlag  $J_{13, 15, 16_1c}$  wog 1,11 g und zeigte im Gegensatz zu den ersten beiden hämolytisch unwirksamen Fraktionen gegenüber Pferdeblutkörperchen den hämolytischen Index 1250.

Durch Versetzen des Zentrifugats von  $J_{13, 15, 16_1c}$  mit dem doppelten Volumen Äther wurde die Fraktion  $J_{13, 15, 16_1d}$  (0,32 g) vom hämolytischen Index 330 erhalten. Nach Einengen des Filtrats dieser Fällung zum Sirup und Auflösen

in 20 ccm Alkohol ergab der Zusatz von 120 ccm Äther noch 0,17 g  $J_{13,15,16_1e}$  vom hämolytischen Index 100.

Die gleiche Fraktionierung von 17,2 g der ersten Fraktionen der Versuche 18 und 19 lieferte 1,98 g  $J_{18,19_1a}$ , 13,12 g  $J_{18,19_1b}$  (beide hämolytisch unwirksam), 0,62 g  $J_{18,19_1c}$  vom hämolytischen Index 500 und noch 0,62 g  $J_{18,19_1d}$  vom hämolytischen Index 1000.

1,07 g der zweiten Fraktionen der Versuche 15 und 16 wurden mit 15 ccm Wasser verrührt, wobei sich der größte Teil auflöste. Unlöslich  $J_{15,16_2a} = 0,07$  g. Diese Fraktion war hämolytisch unwirksam und bestand in der Hauptsache aus Rutin.

Filtrat und Waschwasser (22 ccm) wurden in 450 ccm 99-prozent. Alkohol eingegossen und ergaben die ebenfalls hämolytisch unwirksame Fällung  $J_{15,16_2b} = 0,57$  g. Das Zentrifugat wurde im Faust-Heimschen Verdunstungskasten zum Sirup gebracht, dieser mit 4 ccm Wasser + 2 ccm Alkohol verrührt und in 150 ccm 99-prozent. Alkohol eingegossen. Es entstand die Fällung  $J_{15,16_2c} = 0,18$  g vom hämolytischen Index 2000. Durch erneutes Einengen des Filtrats zur Trockne, Lösen des Rückstandes in 1 ccm Wasser und 50 ccm Alkohol und Versetzen mit 100 ccm Äther wurde die Fraktion  $J_{15,16_2d} = 0,17$  g vom hämolytischen Index 1000 erhalten.

Die analoge Aufteilung von 3,7 g der zweiten Fraktionen der Versuche 18 und 19 ergab als wasserunlöslichen Anteil  $J_{18,19_2a} = 1,46$  g, aus denen durch Umkrystallisieren aus Wasser 1,05 g reines Rutin erhalten wurden, und als weitere hämolytisch unwirksame Fällung:  $J_{18,19_2b} = 0,94$  g, die Fraktion  $J_{18,19_2c} = 0,70$  g vom hämolytischen Index 200 und 0,37 g  $J_{18,19_2d}$  vom hämolytischen Index 200.

Eine ähnliche Zerlegung der dritten Fraktionen von Versuch 15 und 16 führte nicht zu hämolytisch stärker wirksamen Präparaten. Bei Verrühren von 8,1 g  $J_{15,16_3}$  mit 40 ccm Wasser blieben 0,04 g  $J_{15,16_3a}$  ungelöst. Die Fällung der mit dem Waschwasser 57 ccm betragenden Lösung mit 1150 ccm Alkohol lieferte 4,71 g  $J_{15,16_3b}$  vom hämolytischen Index 200. Zusatz der gleichen Menge Äther zum Filtrat ergab die nur ganz schwach hämolytisch wirksame Fraktion  $J_{15,16_3c} = 1,82$  g.

Nach Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen in 2 ccm Wasser + 2 ccm Alkohol und Eingießen in 100 ccm 99-prozent. Alkohol wurden 0,07 g hämolytisch unwirksame Substanz  $J_{15,16_{3d}}$  erhalten. Versetzen des Zentrifugats mit dem doppelten Volumen Äther führte zu 0,88 g  $J_{15,16_{3e}}$  vom hämolytischen Index 200. Aus den Präparaten  $J_{15,16_{3b}}$  und  $J_{15,16_{3c}}$  konnten jedoch durch Auskochen mit 95-prozent. Alkohol stärker wirksame Fraktionen gewonnen werden.

5,32 g dieser Substanzen wurden 1 Stunde mit 125 ccm 95-prozent. Alkohol ausgekocht. Vom unlöslichen Rückstand wurde heiß abgesaugt; beim Abkühlen und mehrstündigen Stehen im Eisschrank schieden sich 0,64 g  $J_{15,16_{3g}}$  vom hämolytischen Index 1700 ab. Versetzen des Filtrats und Waschalkohols (insgesamt 180 ccm) mit dem dreifachen Volumen Äther lieferte die schwach hämolytisch wirksame Fraktion  $J_{15,16_{3g}}$ , = 0,88 g.

Der Rückstand der ersten Extraktion wurde ein zweites Mal mit 125 ccm 95-prozent. Alkohol 1 Stunde ausgekocht. Wiederum wurde heiß abgesaugt und die Lösung abgekühlt. Bei mehrstündigem Stehen setzten sich 0,24 g  $J_{15,16_{3h}}$  ab, die hämolytisch unwirksam waren. Fällung des mit dem Waschalkohol vereinigten Filtrats (160 ccm) mit der dreifachen Menge Äther lieferte 0,35 g  $J_{15,16_{3h}}$  vom hämolytischen Index 570.

Eine dritte Auskochung des in 95-prozent. Alkohol unlöslichen Rückstandes mit 90-prozent. Alkohol ergab sowohl beim Abkühlen des Alkoholextraktes als auch beim Fällen der Alkohollösung mit Äther nur hämolytisch unwirksame Präparate.

Durch einstündiges Auskochen von 11,3 g  $J_{18,19_3}$  mit 250 ccm 95-prozent. Alkohol, Absaugen in der Hitze und Abkühlen des Extraktes wurden 1,68 g  $J_{18,19_{3a}}$  vom hämolytischen Index 800 erhalten. Versetzen des Filtrats mit dem dreifachen Volumen Äther lieferte die sehr schwach hämolytisch wirksame Fällung  $J_{18,19_{3a}}$  = 2,71 g. Nach Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen des Rückstandes in 1 ccm Wasser + 25 ccm Alkohol wurden durch Zusatz von 75 ccm Äther noch 0,34 g  $J_{18,19_{3a}}$  vom hämolytischen Index 150 abgeschieden.

Durch weitere Auskochungen des Rückstandes der ersten Extraktion mit 95- und 90-prozent. Alkohol entstanden beim



Abkühlen sowie bei Fällung der Lösungen mit Äther nur hämolytisch sehr schwach aktive, bzw. unwirksame Präparate.

Die 4. Fraktionen von Versuch 15 und 16 (vgl. Tab. I) wurden in 150 ccm Wasser gelöst. Die Lösung blieb über Nacht im Eisschrank stehen; dabei schied sich praktisch reines Rutin als  $J_{15,16_4a}$  (0,87 g) ab. Durch Einengen des Filtrats auf etwa 15 ccm und Fällen mit 400 ccm Alkohol entstand die hämolytisch unwirksame Fällung  $J_{15,16_4b} = 0,90$  g. Zusatz des doppelten Volumens Äther zum Filtrat lieferte die Fraktion  $J_{15,16_4c} = 4,6$  g vom hämolytischen Index etwa 100. Nach Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen in 2 ccm Wasser und 200 ccm Alkohol und Zusatz von 600 ccm Äther wurden 1,6 g  $J_{15,16_4d}$  vom hämolytischen Index 200 niedergeschlagen. Erneutes Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen des Rückstandes in 100 ccm Alkohol und Fällen mit dem vierfachen Volumen Äther lieferte die Fraktion  $J_{15,16_4e} = 0,85$  g vom hämolytischen Index 400.

Die 4. Fraktionen der Versuche 18 und 19 wurden durch Auskochen mit Alkohol weiter aufgeteilt. 10,1 g  $J_{18,19_4}$  wurden mit 150 ccm 99-prozent. Alkohol  $\frac{1}{2}$  Stunde gekocht; die Lösung wurde durch Absaugen abgetrennt. Beim Abkühlen schieden sich 0,82 g  $J_{18,19_4a}$  ab, die keine hämolytische Wirkung zeigten. Das mit dem Waschalkohol vereinigte Filtrat (230 ccm) wurde mit 700 ccm Äther versetzt. Dabei wurden 5,88 g  $J_{18,19_4a_2}$  vom hämolytischen Index 400 niedergeschlagen. Das Filtrat wurde zum Sirup eingeeengt, in 60 ccm 99-prozent. Alkohol gelöst und mit 180 ccm Äther gefällt. Die dadurch entstehende Fraktion  $J_{18,19_4a_2} = 0,75$  g wirkte nicht hämolytisch.

Durch Auffüllen des Filtrats mit Äther auf 600 ccm entstand eine weitere Fällung  $J_{18,19_4a_4} = 0,25$  g vom hämolytischen Index 330.

Da der Rückstand der Auskochung mit 99-prozent. Alkohol noch starke Hämolyse bewirkte, wurde er noch einmal 1 Stunde mit 100 ccm 95-prozent. Alkohol in der Siedehitze extrahiert, wobei sich praktisch alles löste. Beim Abkühlen schieden sich 0,29 g  $J_{18,19_4b_2}$  ab, die hämolytisch aber unwirksam waren.

Filtrat und Waschalkohol wurden vereinigt (195 ccm) und mit dem doppelten Volumen Äther gefällt. Es entstand der

ebenfalls nicht hämolysierende Niederschlag  $J_{18, 19_4 b_2} = 1,04$  g. Durch Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen des Rückstandes in 50 ccm Alkohol und Fällen mit 200 ccm Äther wurden 0,38 g  $J_{18, 19_4 b_2}$  vom hämolytischen Index 500 gewonnen.

Aus den 5. Fraktionen der Versuche 15 und 16 wurden durch Lösen in etwa 30 ccm Wasser und 15-stündiges Stehen der wäßrigen Lösung im Eisschrank 0,77 g kristallisiertes Rutin erhalten. Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen in 200 ccm Alkohol und Zugabe von 800 ccm Äther führten zu Fraktion  $J_{15, 16_5 b} = 0,95$  g vom hämolytischen Index 200. Durch nochmaliges Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen in 100 ccm Alkohol und Fällen mit 400 ccm Äther wurden noch 0,6 g sehr hygroskopische Fällung  $J_{15, 16_5 c}$  vom hämolytischen Index etwa 100 erhalten.

2,5 g der 5. Fraktionen von Versuch 18 und 19 —  $J_{18, 19_5}$  — wurden in 30 ccm Wasser gelöst. Beim Stehen der Lösung im Eisschrank schieden sich 0,30 g Rutin ab. Das wäßrige Filtrat wurde zum Sirup eingeengt, in 100 ccm Alkohol gelöst und mit 200 ccm Äther gefällt. Der entstandene Niederschlag von 0,72 g  $J_{18, 19_5 b}$  zeigte keine hämolytische Wirkung. Auffüllen des Filtrats mit Äther auf 600 ccm lieferte 0,29 g  $J_{18, 19_5 c}$  vom hämolytischen Index 150, und Zufügen von weiteren 400 ccm Äther zu der Mutterlauge führte zu der Fraktion  $J_{18, 19_5 d} = 0,30$  g vom hämolytischen Index 200. Das dann durch Einengen des Filtrats zum Sirup, Lösen in 30 ccm Alkohol und Fällen mit 90 ccm Äther erhaltene Präparat war hämolytisch unwirksam.

## B

In anderen Versuchen wurde der mit Äther extrahierte Tabak, wie vorher vgl. S. 32 angegeben ist, mit 70-prozent. Alkohol ausgekocht, der Auszug jedoch auf die Hälfte des vorher angegebenen Volumens eingeengt. Der Extrakt von 320 g Tabak wurde also auf 160 ccm konzentriert und dann wieder durch Eingießen in das 20-fache Volumen Alkohol gefällt. So wurden in dem Versuch 9 aus 320 g Tabakpulver 21,9 g Präparat  $J_9$ , und in dem Versuch 10 aus 480 g Tabakpulver 27,5 g  $J_{10}$  erhalten. Beim Aufnehmen von 40 g  $J_9$  und  $J_{10}$  mit 200 ccm kaltem Wasser blieben 2,4 g  $J_9, 10_c$  unlöslich. Eingießen des

mit dem Waschwasser vereinigten Filtrats (260 ccm) in 5,2 Liter Alkohol gaben die hämolytisch unwirksame Fraktion  $J_{9,10_b}$  = 28,14 g. Das Zentrifugat dieses Niederschlags wurde zum Sirup eingeeengt, in 20 ccm Wasser gelöst und in 400 ccm Alkohol eingegossen. Die dadurch erhaltene Fraktion  $J_{9,10_c}$  = 4,9 g wies den hämolytischen Index 500 auf. Zusatz der 3-fachen Menge Äther zum Filtrat erzeugte den Niederschlag  $J_{9,10_d}$  = 1,60 g vom hämolytischen Index 500. Durch Einengen des Filtrats von  $J_{9,10_d}$  zum Sirup, Lösen in 50 ccm 99-prozent. Alkohol und Versetzen mit 150 ccm Äther wurden noch 0,88 g  $J_{9,10_e}$  gleichfalls vom hämolytischen Index 500 gefällt.

### C

In dem im folgenden beschriebenen Versuch 20 wurde die Darstellung saponinhaltiger Präparate auf etwas andere Weise vorgenommen.

100 g mit Äther extrahierten Tabaks wurden mit 1 Liter 90-prozent. Alkohol 1 Stunde gekocht. Es wurde heiß abgesaugt, die Lösung zum Sirup eingeeengt, mit 6 ccm Wasser aufgenommen und mit 400 ccm Alkohol gefällt. Ausbeute:  $J_{20_a}$  = 1,24 g hämolytisch unwirksamer Substanz.

Filtrat und Waschkohol wurden vereinigt (465 ccm) und mit den doppelten Volumen Äther versetzt. Es entstand der schwach hämolytisch wirksame Niederschlag  $J_{20_a}$  = 1,56 g, der Rutin enthält. Eine 2-stündige Auskochung des Rückstandes der 1. Fraktion, wieder mit 1 Liter 90-prozent. Alkohol, lieferte bei gleicher Behandlung des Filtrats die ebenfalls hämolytisch unwirksame Fällung  $J_{20_b}$  von 0,59 g. Auf Zusatz der 3-fachen Menge Äther zu dem mit Waschkohol vereinigten Filtrat fielen 0,50 g  $J_{20_b}$  vom hämolytischen Index 670 nieder.

Eine 3. 2-stündige Auskochung des Tabakrückstandes mit 1 Liter 80-prozent. Alkohol führte bei analoger Behandlung des Filtrats zu dem Präparat  $J_{20_c}$  = 1,10 g, das ebenfalls hämolytisch unwirksam war. Zugabe der 3-fachen Menge Äther zu dem mit dem Waschkohol vereinigten Filtrat von 450 ccm bewirkte die Fällung  $J_{20_c}$  = 0,50 g vom hämolytischen Index 1700. Eine 4. 2-stündige Auskochung mit 1 Liter 80-prozent. Alkohol,

Konzentration des Filtrats zum Sirup, Aufnehmen in 6 ccm Wasser und Fällen mit 400 ccm Alkohol, lieferte die hämolytisch unwirksame Fraktion  $J_{20, d_1} = 0,60$  g. Das durch Ätherfällung des Filtrats erhaltene Präparat  $J_{20, d_1} = 0,16$  g hatte den hämolytischen Index 1000.

### D

#### Hämolyseversuche mit verschiedenen Blutsorten

Die Präparate  $J_{15, 16_3, g_1}$ ,  $J_{15, 16_2, c}$ ,  $J_{15, 16_2, d}$  und  $J_{15, 16_1, c}$  wurden zu 0,2-prozent. Lösung in 0,9-prozent. Kochsalzlösung von zugleich m/15-Phosphatgehalt ( $p_H = 7,3$ ) gelöst. Diese Lösungen wurden auf ihre hämolytische Wirkung gegenüber 1-prozent. Suspensionen der gewaschenen Blutkörperchen von Pferd, Rind, Schwein und Hammel geprüft.

Die hämolytischen Indizes sind in der folgenden Tab. II angegeben:

Tabelle II  
Blutkörperchen von

Hämolytischer Index von	Pferd	Rind	Schwein	Hammel
$J_{15, 16_3, g_1}$	1700	1700	3300	1000
$J_{15, 16_2, c}$	2000	2500	4000	1700
$J_{15, 16_2, d}$	1000	1250	1700	1000
$J_{13, 15, 16_1, c}$	1250	1250	1700	< 1000

### E

#### Hemmung der Hämolyse durch Cholesterin

Zu den Hemmungsversuchen wurde eine 0,2-prozent. wäßrige Suspension von Cholesterin<sup>1)</sup> verwendet. Sie wurde hergestellt, indem eine Lösung von Cholesterin in Aceton zunächst in warmes Wasser gegossen und dann das Aceton auf dem Wasserbade vertrieben wurde.

a) 3 ccm 0,4-prozent. Lösung des Präparates  $J_{15, 16_3, g_1}$  in einer 1,8-prozent. Kochsalzlösung von 2 m/15-Phosphatgehalt ( $p_H 7,3$ ) wurden mit 3 ccm der 0,2-prozent. Cholesterinsuspension 16 Stunden bei 37° aufbewahrt. Sodann wurde zentrifugiert und

<sup>1)</sup> G. Jahnsen-Blohm, Ztschr. physiol. Chem. 85, 59 (1913).

1 ccm dieser Lösung zu 1 ccm 1-prozent. Pferdeblutkörperchensuspension in Phosphatkochsalzlösung gefügt. Innerhalb 8 Stunden trat keine Hämolyse ein.

Zum Vergleich wurden 3 ccm derselben 0,4-prozent. Lösung  $J_{15, 16, 3, 2}$  mit 3 ccm Wasser ebenfalls 16 Stunden bei  $37^{\circ}$  aufbewahrt. Dann wurden die Hämolyseversuche in gleicher Weise angestellt; nach wenigen Minuten trat vollkommene Auflösung der Blutkörperchen ein.

b) 15 ccm 1-prozent. Lösung des Präparates  $J_{13, 15, 16, 1, 6}$  in einer 1,8-prozent. Kochsalzlösung mit 2 m/15-Phosphatgehalt ( $p_H$  7,3) wurden mit 15 ccm 0,2-prozent. wäßriger Cholesterinsuspension 16 Stunden bei  $37^{\circ}$  in Berührung gelassen. Sodann wurden 5 ccm zentrifugiert. Die erhaltene Lösung bewirkte innerhalb 8 Stunden keine Hämolyse.

Eine entsprechende nicht mit Cholesterin behandelte Vergleichslösung wirkte stark hämolytisch; bereits durch Zusatz von 0,4 ccm dieser Lösung zu 1 ccm Blutkörperchensuspension wurde vollständige Hämolyse erzielt.

Durch Entfernung des Cholesterins wurde auch die Hämolysehemmung aufgehoben.

20 ccm der Saponin-Cholesterinsuspension (s. oben) in der durch 16-stündige Digestion bei  $37^{\circ}$  die Bindung der Komponenten bewirkt war, wurden insgesamt 8 Stunden mit 60 ccm Xylol am Rückflußkühler gekocht. Nach je 2 Stunden wurde der größte Teil der Xylolschicht abpipettiert und durch frisches Xylol ersetzt. Zum Schluß wurde im Scheidetrichter getrennt, die wäßrige Schicht filtriert und mittels Durchleiten von Stickstoff ein geringer Rest Xylol entfernt. Diese so von Cholesterin befreite Lösung wirkte nun wieder stark hämolytisch.

Diese mühseligen Untersuchungen, bei deren Ausführung wir uns der Hilfe des Fräulein Charlotte Kühl zu erfreuen hatten, betrachten wir als Vorarbeiten zur Gewinnung von möglichst reinem Tabaksaponin.