

**324. Josef Lindner (mit Norbert Figala und Josef Hager):
Über Primel-Saponine (I. Mitteil.).**

[Aus d. Pharmaz.-chem. Laborat. d. Universität Innsbruck.]

(Eingegangen am 20. August 1934.)

Die Untersuchung der Primel-Saponine wurde vor mehreren Jahren in der Erwägung aufgenommen, daß die von L. Kofler aus *Primula veris* gewonnene Saponin-Substanz wegen ihrer Krystallisationsfähigkeit verhältnismäßig günstige Voraussetzungen für die chemische Untersuchung bieten würde. Die Schwierigkeiten, die sich einer solchen Aufgabe beim ersten Schritt entgegenstellen, das hartnäckige Festhalten von mineralischen und von anderen organischen Stoffen, das Auftreten verwandter Begleitkörper mit ähnlichen Eigenschaften, die hygroskopische Beschaffenheit, der meist amorphe Zustand, der Mangel eines charakteristischen Schmelzpunktes, Eigenschaften, die zugleich die üblichen Mittel der Reindarstellung und die Kriterien auf Einheitlichkeit versagen lassen, machen in bekannter Weise schon die Analyse des Ausgangskörpers unsicher und schließen die Aufstellung zutreffender Molekularformeln aus. Die Krystallisationsfähigkeit des Primel-Saponins schien, ohne zwar eine vollständige Vermeidung dieser Schwierigkeiten zu versprechen, wesentliche Vorteile zu bieten. Ein gewisses erhöhtes Interesse konnte diesem Saponin übrigens auch in anderer Hinsicht zugeschrieben werden.

Die Primel-Droge hat in der offiziellen und hauptsächlich in der Volks-Medizin seit Jahrhunderten vielfache Verwendung für verschiedene Heilzwecke gefunden, und in der Zeit nach dem Weltkrieg ist ihre Einführung als Expektorans an Stelle von *Radix Senegae* von berufener Seite angeregt und empfohlen worden. Dies veranlaßte L. Kofler¹⁾, den wirksamen Bestandteil der Droge, der in dem darin vorhandenen Saponin erblickt wurde, zu isolieren und damit Klarheit in die bisher widersprechenden Literatur-Angaben über das Primel-Saponin zu bringen. Im Zusammenhang damit geht L. Kofler in mehreren Abhandlungen²⁾ auch auf die Beschreibung der Droge *Radix Primulæ*, auf ihre Stammpflanze und die unterlaufenden Verwechslungen, sowie auf die ältere und jüngere Verwendung der Droge näher ein. Diese Fragen nicht-chemischer Art sollen hier nicht weiter verfolgt werden.

Die älteste Angabe der chemischen Literatur über Primel-Stoffe dürfte sich bei Hünefeld³⁾ finden, der aus der Pflanze einen krystallinischen, aber als wasser-löslich angegebenen Stoff „Primulin“ und einen ebenfalls wasser-löslichen, amorphen Körper „Primula-Kratzstoff“, neben einem „Primula-Campher“ isolierte. L. Mutschler⁴⁾ beschäftigte sich eingehend mit der Untersuchung des aus Cyclamen-Knollen gewonnenen Saponins „Cyclamin“, das er mit dem Primulin Hünefelds und übrigens allgemeiner „mit dem Saponin“ für identisch hielt. G. Masson⁵⁾ bespricht die Darstellung

¹⁾ Arch. Pharmaz. **262**, 318 [1924].

²⁾ Pharmazeut. Presse, Folge 2 u. 3, 1922. Arch. Pharmaz. **266**, 479 [1928]; s. ferner L. Kofler: „Die Saponine“, S. 231, Wien 1927. — L. Kofler u. M. Brauner, Arch. Pharmaz. **263**, 424 [1925] und Tschirch-Festschrift, S. 351 [Leipzig 1926].

³⁾ Journ. prakt. Chem. [1] **7**, 57 [1836]. **16**, 111 [1839]. Die Arbeit war im Original nicht zugänglich; ein kurzer Auszug findet sich bei Mutschler, siehe nächste Anmerkung.

⁴⁾ A. **185**, 214 [1877].

⁵⁾ Bull. Sciences pharmacol. **18**, 699 [1911]; C. **1912**, I 1628.

und die Eigenschaften einer wasser-unlöslichen, aber amorphen „Primulinsäure“ (acide primulique). Von O. Engfeldt⁶⁾ wird der Saponin-Gehalt der Droge auf 5,6 % geschätzt und der Gehalt an Saponinsäure als unbedeutend angenommen. Erwähnt sei hier auch die Gewinnung von zwei Glucosiden nicht saponin-arter Natur, Primverin und Primulaverin durch A. Goris, M. Mascré und Ch. Vischniac⁷⁾. L. Kofler gewann in der schon erwähnten Arbeit ein krystallisiertes Saponin, das er als „Primulasäure“ bezeichnet. Auf diese Arbeit, die den Ausgangspunkt für die vorliegende Untersuchung bildete, wird in den folgenden Darlegungen öfter vergleichsweise zurückzukommen sein. In neuerer Zeit wurde die Frage des Primel-Saponins in chemischem Sinne noch von H. Yanagisawa und N. Takashina⁸⁾ berührt, die ein saures Saponin mit weitgehend ähnlichen Eigenschaften aus *Primula Sieboldii* Morr. gewannen und die Identität dieser „Sakuraso-Säure“ mit der Primulasäure Koflers nicht geradezu behaupteten, aber doch als möglich hinstellten.

Die Droe Radix Primulae.

Als Ausgangsmaterial für die zu untersuchende Saponin-Substanz konnte von Anfang an nur die Droe selbst in Betracht kommen. Ohne Verfolgung sonstiger Fragen wurde die ausschließliche Verwendung der Wurzel in Aussicht genommen, um den Schwierigkeiten zu entgehen, die sich einer Abtrennung des Chlorophylls entgegensezten konnten. Nach den Feststellungen Koflers mußte auf die Beschaffung einer Droe von der richtigen Stammpflanze größtes Gewicht gelegt werden. Als solche kommt nur die Pflanze *Primula veris* in Betracht, nach Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis „*Primula officinalis* Jaquin (*Primula veris* α L.)“, in der Praxis manchmal mißverständlich als *Primula vera* bezeichnet. Im Drogenhandel wird diese von *Primula elatior*, nach Hagers Handbuch „*Primula elatior* Jaquin (*Primula veris* β L.)“ nicht unterschieden. Auf die Verwechslung der beiden Pflanzen wird übrigens auch in Hagers Handbuch hingewiesen. Mit Sicherheit lassen sich beide Pflanzen zur Blütezeit auseinanderhalten, da die Blüte von *Primula veris* dottergelb und schwach riechend, jene von *Primula elatior* bläß schwefelgelb und geruchlos ist. In der Handelsdroge Radix Primulae liegt nach Kofler und auch nach unseren neueren Feststellungen überwiegend oder ausschließlich die Droe von der letzteren Sorte vor. Den Angaben Koflers zufolge können nämlich auch die trocknen Wurzeln von *Primula elatior* nach der mehr braunen Färbung und mikroskopisch nach dem Vorkommen von Steinzellen im Mark und in der primären Rinde von der richtigen Wurzel der *Primula veris* unterschieden werden. Das als Untersuchungsmaterial gesuchte krystallisierende saure Saponin ist nach Kofler ausschließlich in *Primula veris* enthalten, während in *Primula elatior* eine amorphe Saponin-Substanz vertreten ist, die sich auch in der physiologischen Wirkung von der krystallisierten Verbindung unterscheidet.

Während somit eine einfache Verarbeitung von Handelsdroge nicht möglich war, hat doch die bekannte Firma Cäsar & Loretz in Halle nach besonderer schriftlicher Aussprache und Betonung der üblichen Verwechslung

⁶⁾ Svensk. farmac. Tidskr. **25**, 31 [1921].

⁷⁾ Bull. Sciences pharmacol. **19**, 577 [1912]; C. **1913**, I 311.

⁸⁾ Journ. pharmac. Soc. Japan **1926**, Nr. 536, S. 81; C. **1927**, I 618.

die Lieferung von einheitlicher Droge *Primula veris* übernommen und mehrere Kilogramm von tatsächlich einwandfreier Ware geliefert. Inzwischen war zur Sicherheit und zur Ermöglichung von Vergleichen unter verschieden-seitiger Mitwirkung auch eine eigene Sammlung durchgeführt worden, teils eigenhändig und unter Mitwirkung einiger Schüler, teils durch verlässliche Sammler. Die Mitarbeit der letzteren verdanke ich dem freundlichen Entgegenkommen der HHrn. Ing. Ludwig Marchal, Pflanzenbau-Oberinspektor, und Prof. A. Sperlich, Vorstand des Botanischen Institutes der hiesigen Universität. Alle Vorräte der letzteren Art mit einer unbedeutenden Ausnahme wurden im Gebiet des mittleren Inntales im engeren und weiteren Bereich der Stadt Innsbruck gesammelt, sämtliche Vorräte einschließlich jener von Cäsar & Loretz zur Blütezeit. Die einlaufenden Proben wurden, soweit es die Umstände erlaubten, gesondert verwahrt und verarbeitet, um die Möglichkeit für spätere Vergleiche offen zu lassen. Die im Gebiet von Innsbruck gesammelten Wurzeln wurden stets in frischem Zustand von grünen Teilen vollständig befreit und von Erde reingewaschen, darauf in luftigen Räumen zur Trocknung ausgebreitet. Eine Einwirkung der Sonne wurde dabei stets vermieden. Die von Cäsar & Loretz erhaltenen Wurzeln mußten zur vollständigen Befreiung von anhaftender Erde nochmals angefeuchtet, gewaschen und getrocknet werden. Auf eine Beschreibung der Droge dürfte an dieser Stelle verzichtet werden können⁹⁾.

Zerkleinerung und Extraktion der Droge.

Die Zerkleinerung der getrockneten Wurzeln, besonders der kräftigen Wurzelstücke, zum Zwecke der Extraktion bereitete bei Aufarbeitung größerer Mengen zunächst einige Schwierigkeiten. Es ließ sich feststellen, daß zur vollständigen Gewinnung des Saponins eine weitgehende Zermahlung notwendig ist. Wurde grobes Pulver 3-mal mit Alkohol ausgezogen und zur Feststellung eines restlichen Saponin-Gehaltes nach den näheren Angaben von R. Fischer¹⁰⁾ in Blut-Gelatine gebracht, so trat keine hämolytische Wirkung durch noch vorhandenes Saponin ein. Die Reaktion trat jedoch auf, wenn die groben Körner weiter zermahlen wurden. Das Saponin ist demnach durch Einschließung in den Körnern der Extraktionswirkung des Alkohols, wie auch seiner hämolytischen Einwirkung auf die Blut-Gelatine entzogen.

Das Zermahlen größerer Mengen mit einer Handmühle gestaltete sich sehr beschwerlich. Durch das Entgegenkommen einer Drogenfirma waren wir in der Lage, die Zerkleinerung in einer großen Mühle mit Motorbetrieb vorzunehmen, wobei aber die starke Staubbildung beträchtliche Verluste und durch die Einwirkung auf die Atmungsorgane schwere Unannehmlichkeiten verursachte. Der Staub bewirkte bei dieser starken Einwirkung Speichel-fluß, stechende Schmerzen in den Bronchien und Schmerzen der Mund-Schleimhaut, ohne aber schädliche Nachwirkungen zu hinterlassen.

Auch das erschöpfende Auskochen mit Alkohol nach dem Vorgang Koflers zeigte bei Verarbeitung größerer Mengen schwere Unzukömmlichkeiten, indem sich das wiederholte Kochen und Filtrieren zeitraubend gestaltete, zur Ansammlung großer Flüssigkeitsmengen führte und besonders auch dadurch, daß die schon mehrfach ausgekochte Masse beim neuerlichen Auskochen ein heftiges Stoßen verursachte.

⁹⁾ Eine eingehende Beschreibung gibt L. Kofler in der Pharmazeut. Presse, a. a. O.

¹⁰⁾ Pharmazeut. Monatsh. **9**, 1 und 25 [1928], ferner Monatsh. Chem. **56**, 282 [1930].

Die erschöpfende Extraktion von etwa 300 g Droge in einem einzelnen Arbeitsgang läßt sich mit dem folgenden einfachen, für den vorliegenden Zweck konstruierten Apparat ohne Störungen durchführen. Als Behälter für die zerkleinerte Droge dient ein Glaszylinder von 8 cm Weite und 25 cm Höhe, der unten nach Art der Glasfilter-Geräte mit einer grobkörnigen Sinterplatte abgeschlossen und zu einem stumpfen Konus verengt ist. Das Gefäß wurde von der Firma Schott & Gen. auf Bestellung geliefert. Dieser Behälter wird mit Hilfe einfacher Drahtstützen in einem weiteren, unten ebenfalls verengten Rohr so festgehalten, daß zwischen beiden Rohren ein gleichmäßiger Zwischenraum freibleibt. Das äußere Rohr wird mit dem unteren verengten Ende in einen Rundkolben von $2\frac{1}{2}$ –3 l eingesetzt und oben mit einem Kugel-Kühler versehen. Im Kolben wird der Alkohol als Extraktionsmittel zum Kochen erhitzt. Der im Kühler kondensierte Alkohol tropft auf die im Behälter befindliche Droge ab, durchtränkt diese vollständig und gelangt durch die Sinterplatte in den Kochkolben zurück. Die aufsteigenden Dämpfe erhitzen den Behälter mit Droge auf die Siedetemperatur des Alkohols, so daß die Extraktion bei Siedehitze vor sich geht.

Der als zweckmäßig erprobte Vorgang besteht nun darin, daß die grob zerkleinerten Wurzeln zunächst mit der 5–8-fachen Menge von 70-proz. Alkohol in gewöhnlicher Art ein paar Stunden im Kolben gekocht und noch etwas warm abgesaugt werden, wobei rund $\frac{3}{4}$ des Saponins in den Alkohol übergehen. Die abgepreßten Wurzeln werden unvollständig getrocknet und in noch zähem Zustand durch eine Drogenmühle getrieben. Die Zerkleinerung der aufgeweichten Wurzeln bereitete weniger Schwierigkeiten und verursacht kein Verstauben. Das gemahlene Material wird in den Glaszylinder gefüllt und schwach zusammengedrückt, darauf im beschriebenen Apparat mit $1\frac{1}{2}$ l Alkohol mehrere Stunden weiter extrahiert. Dabei tritt kein Stoßen der siedenden Flüssigkeit ein. Ein besonderer Versuch zeigte, daß von dem einen Viertel des Saponins, das sich noch in der Droge befindet, nach 3 Std. der größte Teil, nach 6 Std. praktisch die Gesamtmenge ausgezogen ist.

Zur Extraktion wurde nach Kofler und nach älteren Beispielen 70-proz. Alkohol verwendet. Auf den Umstand, daß die Droge im Extraktionsapparat eigentlich mit höher konzentriertem Alkohol in Berührung kommt, wurde keine Rücksicht genommen. Versuche mit Methylalkohol wurden wegen der ungünstigen Befunde von Kofler nicht vorgenommen, dagegen wurde in 2 Fällen erprobt, ob die mit Verlust verbundene Entfärbung der Extrakte mit Tierkohle eingeschränkt werden könne, wenn die Droge zunächst mit Wasser von einem Teil der färbenden Begleitkörper befreit wird. Die Erfahrung zeigte, daß damit kein Vorteil zu erreichen ist, weil das Wasser nur wenig von den störenden Substanzen, dagegen aber beträchtliche Mengen von Saponin aufnimmt.

Die Verarbeitung der Extrakte. Nachweis eines zweiten Saponins.

Die alkohol. Rohextrakte sind stark braun gefärbt. Zur Aufarbeitung wird, wenn in größerem Maßstabe gearbeitet wird, am besten gleich Wasser zugesetzt und der Alkohol abdestilliert. Der Niederschlag wird durch Filtern und Absaugen gewonnen, das Filtrat zur Probe noch weiter eingengt. Nachdem die in Wasser leicht löslichen Stoffe auf diese Weise entfernt sind, wird der Niederschlag wieder mit 80-proz. Alkohol in Lösung

gebracht, mit Tierkohle entfärbt und warm filtriert. Die Tierkohle wird nochmals mit Alkohol ausgekocht und wieder abfiltriert. Die beiden Filtrate werden vereinigt und nach Zusatz von Wasser wieder der Alkohol abdestilliert. Der nunmehr erhaltene weiße Niederschlag wird nach dem Filtrieren und Absaugen getrocknet und aus 96-proz. Alkohol umkristallisiert. Zur vollständigen Entfärbung ist die Aufwendung beträchtlicher Mengen von Tierkohle erforderlich, die beachtenswerte Mengen von Saponin festhalten.

Die Gesamtausbeute an Saponin betrug in einem einzelnen Fall 10.8 % der Droge, bei 8 anderen Drogen-Vorräten ziemlich gleichmäßig 6.08, 6.00, 5.07, 7.30, 7.70, 6.23, 5.05 und 7.40 %. Ein bestimmter Zusammenhang mit der Eigenart der Droge und des Sammlungsortes konnte nicht herausgefunden werden, doch hat es den Anschein, als ob die Ausbeute bei gut entwickelten Wurzeln, die sich häufig in lockerem Erdreich im Gestüpp entwickeln, mit 7-7 $\frac{1}{2}$ % besser und bei kümmerlich entwickelten Wurzeln mit 5-6 % geringer wäre. Eine 7 $\frac{1}{2}$ -proz. Ausbeute hat auch der beim Vermahlen im großen gebildete und gesammelte Staub (s. o.) ergeben. An der unteren Grenze von 5 % und etwas darüber blieb die von Cäsar & Loretz bezogene Droge. Die größere mechanische Widerstandskraft der Wurzelstücke ermöglichte beim Vermahlen eine Trennung der von den Wurzelstücken und von den feinen Wurzeln stammenden Anteile. Im Saponin-Gehalt trat aber ein eindeutiger Unterschied zwischen diesen Teilen nicht zutage.

Die besonders auffallende Ausbeute von 10.8 % bei einer Droge gab Anlaß, nach 2 Jahren am gleichen Standort nochmals zu sammeln, doch wurde in diesem zweiten Fall eine normale Ausbeute von 6.23 % erzielt. Erwähnt sei noch, daß in diesem besonders hervortretenden Fall einer saponin-reichen Droge das nicht-kristallisierende Saponin (s. u.) stark vertreten war.

Mit diesem durch unmittelbare Bestimmung ermittelten Saponin-Gehalt steht die von Kofler auf Grund hämolytischer Versuche aufgestellte Schätzung in befriedigender Übereinstimmung. Die oben erwähnten Werte liegen aber doch eher etwas höher, wobei zu beachten ist, daß in allen diesen Fällen noch mit einem gewissen Entfall von Saponin durch die hinterbliebenen Mutterlaugen zu rechnen ist.

An dem mit besonders guter Ausbeute auftretenden Saponin verriet sich infolge der leichten Löslichkeit in Alkohol die Gegenwart eines zweiten Saponins neben dem kristallisierenden, das von Kofler bei der Verarbeitung von kleinen Drogen-Mengen allein erfaßt wurde. Beim Ausscheiden aus der Lösung trat neben dem kristallisierten ein amorpher Körper hervor, der das Aussehen von Knöllchen verkleisterter Stärke bot. Dieser Körper schied sich bei wiederholten und geänderten Versuchen stets wieder amorph ab. Das Auftreten des zweiten Körpers, obgleich in kleinerer Menge, konnte dann ausnahmslos auch bei anderen Drogen-Proben festgestellt werden. Der Grund für die verschiedenen Mengenverhältnisse kann mit großer Wahrscheinlichkeit in der Droge gesucht werden, weil absichtliche Änderungen bei der Extraktion und Aufarbeitung keinen Einfluß äußerten. Eine unbeabsichtigte Verfälschung der Droge mit Wurzeln von *Primula elatior*, die, wie oben erwähnt, ein amorphes Saponin liefern, kann in Anbetracht der aufgewendeten Sorgfalt als ausgeschlossen gelten. Ob vielleicht eine Übereinstimmung zwischen dem amorphen *Elatior*-Saponin und dem in größerer oder kleinerer Menge auch in *Primula veris* auftretenden nicht-kristallisierenden Saponin besteht, kann noch nicht entschieden werden.

Eine Möglichkeit zur Trennung beider Saponine hat sich aus der Beobachtung über die Löslichkeit ergeben. Die größere Löslichkeit des amorphen Körpers machte sich auch gegenüber Methylalkohol geltend, der als geeignetes Lösungsmittel wenigstens die Reingewinnung der krystallisierten Verbindung ermöglichte. Wird das Saponin-Gemisch mit einer zur vollständigen Lösung unzureichenden, etwa der 10-fachen Menge Methylalkohol kräftig geschüttelt und darauf filtriert, so kann aus dem ungelösten Teil beim Umkrystallisieren aus Äthylalkohol in den meisten Fällen das schwerlösliche, krystallisierte Saponin schon einheitlich rein gewonnen werden. Mit dem in Methylalkohol gelösten Anteil läßt sich der Vorgang wiederholen. Eine vollständige Befreiung des amorphen Körpers, der schließlich zurückbleibt, vom krystallinischen Saponin ist allerdings durch diesen Trennungs-Vorgang kaum zu erreichen.

Daß im amorphen, bisher nicht krystallisiert erhaltenen Körper ein zweites Saponin vorliegt, das nicht eine andere Modifikation des krystallisierten darstellt, dürfte nach dem folgenden mit hinreichender Sicherheit feststehen. Nach den Ergebnissen der Trennungen, soweit diese auf die angegebene Weise möglich sind, ist der krystallisierte Körper meist 4—6-mal stärker vertreten als der amorphe, in Wahrheit wahrscheinlich noch stärker. In dem einen oben erwähnten, besonders ausgeprägten Fall war das amorphe Saponin in größerer Menge vorhanden.

Die Eigenschaften der Primel-Saponine.

Das krystallisierende Saponin scheidet sich aus Alkohol meist in Form feiner Nadeln ab, die manchmal auch makroskopisch erkennbar sind. Die Nadeln können, nach beiden Seiten zugespitzt, lange Wetzstein-Formen oder, mit parallelen Rändern ausgestattet, Balken-Form aufweisen. Unter Umständen, anscheinend durch größeren Wasser-Gehalt des Alkohols begünstigt, erhält man es in Form kleiner Blättchen. Betrachtet man das leichter lösliche Saponin unter dem Mikroskop, so erscheint es aus winzigen kleinen Kugelchen zusammengesetzt.

Bei der Schmelzpunkts-Bestimmung im üblichen Apparat beginnt sich das krystallisierte Saponin bei 220° zu bräunen, bei 225° tritt unter Blasenbildung Verflüssigung ein. Ein eigentlicher Schmelzpunkt ist der Substanz wahrscheinlich nicht zuzuschreiben. Die Beobachtung stimmt mit jener von Kofler überein. Der nicht krystallisierende Körper verhält sich ähnlich, doch treten die Erscheinungen einige Grade tiefer ein.

Mit dem Auftreten verschiedener Krystallformen dürfte zum Teil zusammenhängen, daß auch die Bestimmung der Löslichkeit nicht zu einheitlichen Ergebnissen führt. Als Lösungsmittel steht hierbei der Alkohol im Vordergrund.

In mehreren Fällen, und zwar bei Aufwendung von überschüssigem Saponin, konnte eine Aufnahme von krystallisiertem Saponin durch wasser-freien Alkohol etwa im Verhältnis 1:120, durch 70-proz. Alkohol im Verhältnis 1:350 bei $15-20^{\circ}$ ermittelt werden. Mit einer reinen, aschen-freien Analysen-Substanz wurde in einem anderen Fall erhalten: Alkohol 100%..... 1:30; 90%..... 1:67; 70%..... 1:125, Methylalkohol..... 1:37.

Wird die kaltgesättigte Lösung in einem geschlossenen Röhrchen im Wasserbade erhitzt, so setzt sich ein Teil des Saponins in durchscheinender Masse ab und geht bei Zimmer-Temperatur sehr langsam wieder in Lösung.

Neben diesen noch nicht näher untersuchten Unstimmigkeiten in der Löslichkeit konnte eine noch auffälligere Erscheinung festgestellt und durch Parallel-Versuche erwiesen werden. Wird krystallisiertes Saponin im Mikro-exsiccator bei 105° getrocknet, so geht es in wenigen Teilen wasser-freien Alkohols glatt in Lösung zum augenscheinlichen Unterschied von einer nicht getrockneten Probe. In einem Fall konnte nach anfänglicher Lösung Wiederausscheidung beobachtet werden, während bei einem schärfer getrockneten Präparat auch durch Einimpfen von Krystallen und Einengen keine Krystallisation mehr erzielt werden konnte, auch nicht bei Verwendung von wasserhaltigem Alkohol als Lösungsmittel. Auch beträchtlicher Wasser-Zusatz führt bei solchen Lösungen keine Ausscheidung herbei. Es muß dahingestellt bleiben, ob diesem möglichen Übergang in eine leichtlösliche Form eine Bedeutung vom Standpunkt der Pflanzen-Physiologie zukommt. Kofler gibt an, eine leichter lösliche Form des Saponins durch Ausfällung aus Alkohol mit Äther erhalten zu haben, und weist im Zusammenhang damit auf die auch von uns zu bestätigende Tatsache hin, daß Wasser aus der Droge mehr Saponin aufnimmt als nach der Löslichkeit des isolierten Körpers in Wasser zu erwarten wäre. Das Saponin könnte demnach in leichter löslicher Form in der Pflanze vorhanden sein, doch ist vielleicht auch eine Beeinflussung der Löslichkeit durch andere, in das Wasser übergehende Stoffe nicht ausgeschlossen.

Von anderen organischen Lösungsmitteln, wie Äther, Aceton, Chloroform, wird das Saponin nur in geringer Menge aufgenommen, desgleichen, wie schon erwähnt, von reinem Wasser. Es wird dagegen leicht auch von verd. Laugen und von Alkalicarbonat-Lösung gelöst. Die Säure-Natur, die darin zur Geltung kommt, ist hinreichend stark ausgeprägt, um eine annähernde Titration mit Phenol-phthalein zu gestatten.

Das nicht-krystallisierende Saponin ist, wie oben erwähnt, leichter löslich als das Haupt-saponin in der krystallisierten Form, im übrigen diesem ähnlich, ebenfalls in Lauge löslich, aber noch nicht eingehend untersucht.

Das aus Alkohol gewonnene Saponin enthält zunächst merkliche Mengen von Mineralbestandteilen. Der Veraschungs-Rückstand wurde mit Substanzmengen von 100 mg nach den Angaben von Fr. Pregl in der Mikro-muffel bestimmt und betrug einige Zehntel Prozent. Durch oft wiederholtes Umkrystallisieren kann er im äußersten Fall bis auf 0.1 % vermindert werden. Um zu einem höheren Reinheitsgrad zu gelangen, war die Anwendung der Elektrodialyse erforderlich, die in anderer Form auch schon von L. Kofler¹¹⁾ und Mitarbeitern angewendet wurde. Für den von uns verfolgten praktischen Zweck und in der Absicht, mehrere Gramm Substanz in einem Arbeitsgang reinigen zu können, konstruierten wir einen Apparat, der im wesentlichen aus 2 Tauch-elektroden mit Membran-Umhüllung und Wasser-Spülung und aus einer Rührvorrichtung besteht. Dieser Apparat ist bereits an anderer Stelle beschrieben worden¹²⁾.

Das Saponin wurde für den Zweck der Dialyse in Methylalkohol gelöst und in das Dialysiergefäß gebracht, das bereits die nötige Menge Wasser enthielt. Die durch Fällung des Saponins entstehende Suspension wurde durch das Rührwerk in ständiger Bewegung gehalten. Auf der Membran der Anode

¹¹⁾ Arch. Pharmaz. **262**, 318 [1924]; Biochem. Ztschr. **160**, 398 [1925].

¹²⁾ Kolloid-Ztschr. **55**, 3 [1931].

setzte sich infolge der Elektrophorese allmählich ein Beschlag ab, der in größeren Zeiträumen mit einer Gummi-Fahne losgelöst wurde. Die anfängliche Stromstärke ging nach mehreren Stunden der Dialyse auf einen geringen Betrag zurück, der zum Teil durch das gelöste Saponin bewirkt sein dürfte. Der Aschen-Gehalt ließ sich von rund 0.4% bis auf 0.01% vermindern.

Feuchtigkeit und auch Alkohol werden von beiden Saponinen sehr zäh festgehalten, und der Erscheinung mußte zum Zwecke einer stichhaltigen Analyse eingehende Beachtung geschenkt werden. Die Untersuchung betraf hauptsächlich wieder das krystallisierte Saponin und zeigte das folgende Verhalten: Die luft-trockne Substanz enthält rund 8% Feuchtigkeit, neben 40-proz. Schwefelsäure beträgt das Mehrgewicht 10%, neben 70-proz. Säure etwa 1% im Vergleich zur Trockensubstanz. Die Trocknung neben konz. Schwefelsäure oder Phosphorpentoxyd verläuft bei 15—20° äußerst träge und täuscht leicht konstantes Gewicht vor. 0.2 g, 2 Tage im Mikro-exsiccator im vollständig trocknen Luftstrom belassen, enthielten noch 1/4% Feuchtigkeit. Bei 75° wird in einigen Stunden praktisch vollständige Verflüchtigung des Wassers erreicht, so daß bei 90°, 100° und etwas darüber nur noch ein Gewichtsverlust von ein paar Hundertstel Prozent eintritt. Bei starker Überschreitung von 100°, von etwa 120° an, setzt ein fortschreitender weiterer Gewichtsverlust ein. Als geeignete Trocken-temperatur von kurzer Dauer konnte daher 105° angenommen werden. Vollständig getrocknetes Saponin nimmt selbst im Exsiccator neben körnigem Calciumchlorid merklich an Gewicht zu, und die rasche Anziehung von Feuchtigkeit erfordert bei der Elementaranalyse besondere Berücksichtigung (s. u.).

In einem Behälter neben offenem 100-proz. Alkohol wird in ungefähr gleichem Ausmaß Alkohol aufgenommen. Von 0.5 g solchen Saponins wurden im Vakuum neben Calciumchlorid selbst nach Tagen noch ein paar Prozent Alkohol festgehalten. Die Verfolgung dieser Tatsache führte zur Feststellung, daß alle vorhandenen Saponin-Präparate Spuren von Alkohol enthielten, die in der Wärme durch einen feuchten Luftstrom fortgeführt und im Wege der Jodoform-Reaktion nachgewiesen werden konnten.

Die Elementaranalysen wurden, um die sonst unterlaufenden Unsicherheiten möglichst zu umgehen, unter genauer Beachtung der vorangehenden Feststellungen vorgenommen, und die Ergebnisse dieses Vorgangs dürften ein allgemeineres Interesse auf dem Gebiet der Saponin-Chemie beanspruchen können.

Als Substanzen dienten zwei krystallisierte Reinpräparate a und b, die aus besonders verlässlicher Droge unabhängig gewonnen waren, ferner zum Vergleich ein amorphes Saponin c. Alle Präparate waren durch Elektrodialyse praktisch aschen-frei gemacht. Nähere Bemerkungen zum maßanalytischen Verfahren der Elementaranalyse, das zur Anwendung kam, und zur Umgehung der hygroskopischen Wirkungen der Substanz bringt die auf S. 1652 folgende Abhandlung.

Für die ersten Analysen des krystallisierten Saponins (a₁ und b₁) wurde die Substanz in der hergebrachten Art im Mikro-exsiccator getrocknet und unter Verwendung eines Wägegläschens gewogen.

a₁) 3.761 mg; CO₂ 3.578 ccm n_{10} , HCl 2.986 ccm n_{10} .
 b₁) 4.210 mg; CO₂ 3.986 ccm n_{10} , HCl 3.321 ccm n_{10} .

gef. C 57.08, 56.81, H 8.00, 7.95.

Für die folgenden Analysen wurde die Substanz zur Entfernung von Alkohol ebenfalls im Mikro-exsiccator getrocknet, dann in einem bedeckten Platin-Gefäß gewogen und der Gehalt an aufgenommenem Wasser durch Trocknung im Verbrennungsrohr bei 105° bestimmt (diese Analysen werden mit Absicht vollzählig angegeben).

- a₂) 3.110 mg feucht; 0.314 ccm n_{10} ... 0.283 mg H₂O.
 2.827 mg trocken; CO₂ 2.745, HCl 2.186 ccm n_{10} .
 b₂) 3.247 mg feucht; 0.392 ccm n_{10} ... 0.353 mg H₂O.
 2.894 mg trocken; CO₂ 2.806, HCl 2.253 ccm n_{10} .
 a₃) 4.527 mg feucht; 0.226 ccm n_{10} ... 0.204 mg H₂O.
 4.323 mg trocken; CO₂ 4.189, HCl 3.370 ccm n_{10} .
 a₄) 5.068 mg feucht; 0.381 ccm n_{10} ... 0.343 mg H₂O.
 4.725 mg trocken; CO₂ 4.559, HCl 3.691 ccm n_{10} .
 a₅) 5.315 mg feucht; 0.422 ccm n_{10} ... 0.380 mg H₂O.
 4.935 mg trocken; CO₂ 4.769, HCl 3.827 ccm n_{10} .
 b₃) 5.489 mg feucht; 0.340 ccm n_{10} ... 0.306 mg H₂O.
 5.183 mg trocken; CO₂ 5.019, HCl 4.033 ccm n_{10} .

Gef.	a ₂	b ₂	b ₃	a ₄	a ₅	b ₃
C	58.26	58.18	58.14	57.89	57.98	58.10
H	7.80	7.85	7.86	7.87	7.82	7.84

Im Mittel (mit Ausschluß von a₂): C 58.06, H 7.85.

Ber. für C ₅₂ H ₈₄ O ₂₃ .	C 57.96, H 7.86, M 1076.67.
„ „ C ₅₂ H ₈₂ O ₂₃ .	C 58.08, H 7.69, M 1074.66.
„ „ C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃ .	C 58.31, H 7.95, M 1090.69.
„ „ C ₅₀ H ₈₀ O ₂₂ .	C 58.10, H 7.81, M 1032.64.
„ „ C ₅₀ H ₈₂ O ₂₂ .	C 57.99, H 7.99, M 1034.66.

Die Analysen a₁ und b₁ zeigen infolge der Wiederaufnahme von Feuchtigkeit nach dem Trocknen um rund 1% zu wenig Kohlenstoff, dagegen zuviel Wasserstoff an. Kofler gibt als Mittel von 3 Analysen, bei denen die Substanz über Phosphorpentoxid, aber anscheinend bei Zimmer-Temperatur, getrocknet worden war, die Werte C 55.04 und H 8.03 an. An der Identität der Substanzen ist gleichwohl nicht zu zweifeln. Es tritt klar hervor, wie stark die Analysen der hochmolekularen Saponin-Substanzen, die eine große Exaktheit erfordern, beim herkömmlichen Vorgang der Trocknung und Wägung durch Feuchtigkeit gestört werden können.

Nach den vorangehenden Analysen ist die Formel C₅₂H₈₄O₂₃ vorläufig als die wahrscheinlichste anzunehmen, weil die Sicherheit der Wasserstoff-Bestimmung durch den Umweg in der Gewichts-Bestimmung der Substanz weniger beeinträchtigt wird als die Kohlenstoff-Bestimmung (s. die auf S. 1652 folgende Abhandlung).

Zur unmittelbaren Molekulargewichts-Bestimmung ist die Methode von Eykman zwar verwendbar, die Zahlen, zwischen 900 und 1100 liegend, fielen aber doch sehr schwankend aus. Die Depression des Erstarrungspunktes zeigte nach längerer Einwirkung des Phenols eine Zunahme, die durch mäßige Erwärmung der Lösung gesteigert werden konnte. Bessere Werte konnten bei der Bestimmung des Äquivalentgewichtes durch Neutralisation mit Natronlauge gegen Phenol-phthalein erreicht werden. Getrocknetes Saponin wurde in ausgekochtem Wasser mit einem kleinen Überschuß von $1/10\text{-}n$.Lauge in Lösung gebracht und $1/10\text{-}n$.Salzsäure bis zur Neutralisation zugesetzt. Erwärmung der Lösung verursacht einen Mehrverbrauch an Lauge und muß

vermieden werden, die Titration erlaubt eine Genauigkeit auf etwa 2 %. Auf 0.6722 g Saponin wurden 6.373 ccm, auf 0.5246 g 4.700 ccm $1/10\text{-}n$. Lauge verbraucht, woraus die Äquivalentgewichte 1055 und 1116 (im Mittel 1085) folgen. Das krystallisierende Primel-Saponin ist damit sicher als einwertige Säure anzusprechen, doch soll die Formel $C_{59}H_{84}O_{23}$ trotz der erzielten Übereinstimmung noch nicht als endgültig hingestellt gelten.

Analysen des amorphen Saponins führten beim gleichen Vorgang zum Ergebnis:

- c₁) 5.514 mg feucht; 0.450 ccm $n/10$... 0.405 mg H_2O .
 5.109 mg trocken; CO_2 4.961, HCl 4.012 ccm $n/10$.
- c₂) 5.471 mg feucht; 0.441 ccm $n/10$... 0.397 mg H_2O .
 5.074 mg trocken; CO_2 4.941, HCl 3.993 ccm $n/10$.
- c₃) 5.486 mg feucht; 0.462 ccm $n/10$... 0.416 mg H_2O .
 5.070 mg trocken; CO_2 4.959, HCl 3.994 ccm $n/10$.
- c₄) 5.218 mg feucht; 0.416 ccm $n/10$... 0.375 mg H_2O .
 4.843 mg trocken; CO_2 4.711, HCl 3.811 ccm $n/10$.

Gef.	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄
C	58.26	58.43	58.69	58.37
H	7.92	7.93	7.94	7.93

Im Mittel C 58.44, H 7.93.

Eine weitere Auswertung dieser Zahlen soll unterbleiben, weil für die vollständige Einheitlichkeit der Substanz keine hinreichende Gewähr besteht. Die Zahlen berechtigen jedoch zur Annahme, daß im amorphen Körper eine selbständige Substanz vorliegt, da der Gehalt an Kohlenstoff und Wasserstoff, trotz gleicher Trocknung, eindeutig höher liegt als beim krystallisierten.

Für die gleiche Annahme spricht auch noch der verschiedene hämolytische Index¹³⁾ beider Substanzen, der für die Charakterisierung der Saponine in physiologischer Hinsicht große Bedeutung besitzt. Hr. Priv.-Doz. Dr. R. Fischer hatte die Freundlichkeit, die beiden Saponine bezüglich ihrer hämolytischen Wirkung zu vergleichen. Die Substanzen wurden in physiologischer Kochsalz-Lösung unter Zusatz der nötigen Menge Lauge gelöst, die Bestimmungen mit defibriniertem Rinderblut durchgeführt. Der Index des krystallisierten Saponins ergab sich zu 25000, jener des amorphen zu 40000–43000. Eine gleichzeitig vorgenommene Bestimmung mit krystallisiertem Saponin, das der Herstellung L. Koflers entstammte, lieferte übereinstimmend 25000. Die abweichende Angabe Koflers¹⁴⁾ von 190000 röhrt (nach Privatmitteilung des Autors) daher, daß bei den älteren Versuchen ein anderes Blut verwendet wurde.

Spaltung des krystallisierten Saponins.

Die Versuche in dieser Richtung zielten vorläufig auf die Gewinnung des analysen-reinen Aglucons ab, um damit weitere Anhaltspunkte für die end-

¹³⁾ S. R. Kobert, Ber. Dtsch. pharmaz. Ges. **22**, 205 [1912]; L. Kofler, „Die Saponine“, S. 125; L. Kofler u. Ph. Adam, Arch. Pharmaz. u. Ber. Dtsch. pharmaz. Ges. **265**, 624 [1927].

¹⁴⁾ L. Kofler, Arch. Pharmaz. u. Ber. Dtsch. pharmaz. Ges. **262**, 318 [1924].

gültige Saponin-Formel zu erlangen. 6.6 g krystallisiertes Saponin wurden einige Stunden mit 8-proz. Schwefelsäure, dann nach Entfernung der zuckerhaltigen Flüssigkeit mit frischer 8-proz. Schwefelsäure im Wasserbade erhitzt. Die Einwirkung währte im ganzen rund 15 Stdn. bei etwa 98–99°. Der ungelöste Körper machte 39.5 % des Saponins aus und bildete ein bräunlich-gelbliches Pulver, das zum großen Teil mit Petroläther in Lösung zu bringen war. Vom Ungelösten ging ein Teil leicht, ein weiterer Teil schwer und allmählich in Benzol über; ein geringer dunkler Rest blieb ungelöst. Aus dem in Benzol leicht löslichen Teil konnte noch in Petroläther lösliches Produkt gewonnen werden.

Das aus Petroläther wiederholt umgefällte Spaltprodukt stellte ein weißes Pulver dar, doch blieben alle Versuche, eine Krystallisation herbeizuführen, erfolglos. Der Körper beginnt sich bei 150° gelb zu färben, sintert bei 154 bis 155° und schmilzt allmählich unter Blasenbildung. Er ist in Alkohol, Benzol, Aceton und dgl. leicht löslich, schwerer in Petroläther, der sich deshalb besser zur Umfällung eignet. Das getrocknete Pulver nimmt an der Luft etwas Feuchtigkeit auf, die bei den Analysen nach dem obigen Vorgang berücksichtigt wurde.

Mit einer aus Petroläther erhaltenen ersten Reinfaktion wurden die Analysenwerte d_1 und d_2 , nach nochmaliger Umfällung d_3 und d_4 erhalten, mit einem aus stark konzentrierter Benzol-Lösung mit Petroläther gefällten Präparat die noch nahezu übereinstimmenden Werte d_5 . Der in Benzol schwer lösliche Teil gab dagegen stark abweichende Analysenwerte d_6 .

- d₁) 4.490 mg feucht; 0.032 ccm n_{10} ... 0.029 mg H₂O.
4.461 mg trocken; CO₂ 5.706, HCl 4.643 ccm n_{10} .
- d₂) 4.415 mg feucht; 0.040 ccm n_{10} ... 0.036 mg H₂O.
4.379 mg trocken; CO₂ 5.643, HCl 4.555 ccm n_{10} .
- d₃) 4.449 mg feucht; 0.010 ccm n_{10} ... 0.009 mg H₂O.
4.440 mg trocken; CO₂ 5.711, HCl 4.607 ccm n_{10} .
- d₄) 3.986 mg feucht; 0.019 ccm n_{10} ... 0.017 mg H₂O.
3.969 mg trocken; CO₂ 5.090, HCl 4.109 ccm n_{10} .
- d₅) 3.946 mg feucht; 0.064 ccm n_{10} ... 0.058 mg H₂O.
3.888 mg trocken; CO₂ 4.978, HCl 3.987 ccm n_{10} .
- d₆) 3.648 mg feucht; 0.168 ccm n_{10} ... 0.151 mg H₂O.
3.497 mg trocken; CO₂ 4.084, HCl 3.246 ccm n_{10} .

Gef.	d ₁	d ₂	d ₃	d ₄	d ₅	d ₆
C (76.75?)	77.32	77.18	76.95	76.82	76.82	70.07
H 10.49	10.48	10.46	10.44	10.34	10.34	9.36

Im Mittel von d₂ bis d₄ C 77.15, H 10.46; ber. für C₂₅H₄₀O₃ C 77.26, H 10.39,
,, C₃₃H₅₄O₄ C 76.98, H 10.58.

Eine bestimmte Beziehung zwischen der Zusammensetzung des Spaltproduktes und jener des Saponins kann auf Grund der vorliegenden Analysen noch nicht aufgestellt werden. Die elementare Zusammensetzung des Aglucons dürfte mit großer Annäherung ermittelt sein, doch soll die Formel C₂₅H₄₀O₃ nur als vorläufig wahrscheinlichste betrachtet werden (vergl. die Bemerkungen in der folgenden Abhandlung). Über die Versuche zur Gewinnung krystallisierbarer Derivate des Spaltproduktes kann noch nicht abschließend berichtet werden.

Die Arbeiten auf dem Gebiet der Primel-Saponine haben durch die Beschäftigung mit der Methode der maßanalytischen Elementaranalyse langdauernde Unterbrechungen und Verzögerungen erlitten. Die vorliegende Abhandlung verfolgt unter anderem auch den Zweck, Beispiele für die Anwendbarkeit des neuen Mikro-Analysenverfahrens zu bringen, die in der folgenden Abhandlung vom Gesichtspunkt des Analytikers erörtert werden sollen.

Die Untersuchungen über Primel-Saponine werden fortgeführt.

325. Josef Lindner: Fehlerquellen in der organischen Elementaranalyse, X. Mitteil.: Die Bedeutung genauer Wasserstoff-Bestimmungen und die Behandlung hygroskopischer Substanzen.

[Aus d. Pharmaz.-chem. Laborat. d. Universität Innsbruck.]

(Eingegangen am 20. August 1934.)

In 9 vorangegangenen Mitteilungen¹⁾ über Fehlerquellen in der organischen Elementaranalyse wurden die störenden Einflüsse auf die Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmung verfolgt in der Absicht, zu einer möglichst einwandfreien Versuchs-Anordnung, im besonderen zu einer schärferen Erfassung der Wasserstoff-Werte, zu gelangen. Durch Auswertung dieser Untersuchungen konnte das im Jahre 1925 bekanntgegebene maßanalytische Verfahren²⁾ der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmung zu einem Mikro-Verfahren weiterentwickelt werden, mit dem der beabsichtigte Erfolg weitgehend erreicht wird. Zur Veröffentlichung der Methode ist die Herausgabe einer Monographie geplant. Im folgenden soll, um für den Gegenstand Interesse zu erwecken, der Vorteil der genauen Wasserstoff-Bestimmung im Anschluß an die Analyse von Saponin-Substanzen in der voranstehenden Abhandlung erörtert werden. Es hat sich bei dieser analytischen Aufgabe außerdem eine besondere praktische Ausnutzung der genauen Bestimmbarkeit des Wasserstoffes ergeben, der eine allgemeinere Bedeutung bei der Untersuchung hygroskopischer Körper zukommt.

A. Allgemeine Bedeutung genauer Wasserstoff-Bestimmungen.

Der Zweck der Elementaranalyse kommt am klarsten in der Aufstellung der Bruttoformel der analysierten Verbindung zum Ausdruck, die durch $C_{Z_C}H_{Z_H}O_{Z_O}N_{Z_N} \dots$ wiedergegeben sei³⁾. Wird der Prozentgehalt der Bestandteile, als theoretisch genau vorausgesetzt, mit c, h, o, n ... angegeben, so geben $\frac{c}{12}$, $\frac{h}{1.008}$, $\frac{o}{16}$, $\frac{n}{14} \dots$ die verhältnismäßigen Mengen in Grammatomen an, und es findet sich eine Zahl f', die zu den ganzzahligen Werten $Z_C = \frac{c}{12} \cdot f'$, $Z_H = \frac{h}{1.008} \cdot f'$, $Z_O = \frac{o}{16} \cdot f'$, $Z_N = \frac{n}{14} \cdot f' \dots$ führt. Den Faktor f' findet man, indem man alle Quotienten durch einen unter ihnen, z. B. $\frac{n}{14}$, teilt, so daß man für dieses eine Element N die Bezugszahl 1 erhält. Es ist dann Z_N die kleinste ganze Zahl, die mit allen Quotienten zweiter Art ($\frac{c}{12}$: $\frac{n}{14}$ usw.) multipliziert, ganze Zahlen liefert. Demnach ist $f' =$

¹⁾ IX. Mitteil.: B. 65, 1696 [1932].

²⁾ Ztschr. analyt. Chem. 66, 305 [1925]; vergl. auch B. 55, 2025 [1922].

³⁾ vergl. Ztschr. analyt. Chem. 66, 308 [1925].