

VOORKOMEN, BEREIDING EN EIGENSCHAPPEN VAN DE, IN DE NATUUR AANGETROFFEN, URONZUREN EN VAN ENKELE VERWANTE ZUREN.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE TECHNISCHE WETENSCHAP AAN DE TECHNISCHE HOOGESCHOOL TE DELFT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS, DR. J. G. RUTGERS, HOOGLEERAAR IN DE AFDEELING DER ALGEMEENE WETENSCHAPPEN, VOOR EEN COMMISSIE UIT DEN SENNAAT TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 30 MEI 1934, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

HERMAN ANTHONIE FRANKEN,

SCHEIKUNDIG INGENIEUR,

GEBOREN TE SITOEBONDO.



1012 @ 127

NAAMLooZE VENNOOTSCHAP W. D. MEINEMA, DELFT.

DIT PROEFSCHRIFT IS GOEDGEKEURD DOOR DEN
PROMOTOR PROF. DR. IR. G. VAN ITERSON JR.

Aan mijn Oom.

Aan mijn Verloofde.

INHOUD.

INLEIDING	11
HOOFDSTUK I.	
Vroegere onderzoekingen over glucuronzuur . .	15
§ 1. Vorming, bereiding en eigenschappen van glucuronzuur	15
§ 2. Het voorkomen van glucuronzuur als uitscheidingsproduct van het dierlijke lichaam	19
§ 3. Het voorkomen van glucuronzuur als bestanddeel van het dierlijke lichaam	21
§ 4. Het voorkomen van glucuronzuur in plantenproducten	22
HOOFDSTUK II.	
Vroegere onderzoekingen over galacturonzuur	27
§ 1. Identificatie, bereiding en eigenschappen van galacturonzuur	27
§ 2. Het voorkomen van galacturonzuur in de pectinstoffen	30
§ 3. Het voorkomen van, niet in pectine gebonden, galacturonzuur in de planten	36
HOOFDSTUK III.	
Vroegere onderzoekingen over polymannuronzuren en fucoïdinezuur	38
§ 1. Vroegere onderzoekingen over het alginezuur (polymannuronzuur A)	38
§ 2. Vroegere onderzoekingen over het fucinezuur (polymannuronzuur B)	41
§ 3. Vroegere onderzoekingen over het fucoïdinezuur . .	42
HOOFDSTUK IV.	
Vroegere onderzoekingen over het ascorbinezuur (vitamine C)	43
§ 1. Ontdekking en isoleering van ascorbinezuur	43
§ 2. Eigenschappen, structuur en synthese van ascorbinezuur	44
§ 3. Ascorbinezuur is identiek met vitamine C	48
Aanhangsel	49

HOOFDSTUK V.

Bereiding van cordofanzuur, aldobionzuur en glucuronzuur	51
§ 1. Bereiding van cordofanzuur, aldobionzuur en glucuronzuur uit arabische gom volgens de eerste methode van F. WEINMANN	51
§ 2. Bereiding van glucuronzuur uit arabische gom volgens de tweede methode van F. WEINMANN	57
§ 3. Bereiding van glucuronzuur uit euxanthinezuur	57
§ 4. Bereiding van natriumglucuronaat	59
§ 5. Inwerking van verdunde natronloog op glucuronzuurlacton.	59

HOOFDSTUK VI.

Bereiding van galacturonzuur	61
§ 1. Bereiding van galacturonzuur uit citroenpectine volgens de methode van F. EHRLICH	61
§ 2. Bereiding van galacturonzuur uit polygalacturonide volgens de methode van K. P. LINK	62
§ 3. Bereiding van natriumgalacturonaat uit galacturonzuur	64

HOOFDSTUK VII.

Bereiding der polymannuronzuren A en B (resp.: algine- en fucinezuur)	65
§ 1. Nomenclatuur en gebezigd materiaal	65
§ 2. Bereiding van een mengsel van polymannuronzuur A en B	65
§ 3. Bereiding van polymannuronzuur A	67
§ 4. Bereiding van polymannuronzuur B	68

HOOFDSTUK VIII.

Bereiding en identificatie van mannuronzuurlacton	70
§ 1. Bereiding van mannuronzuurlacton volgens de methode van W. L. NELSON en L. H. CRETCHER	70
§ 2. Bereiding van mannuronzuurlacton volgens de methode van E. SCHOEFFEL en K. P. LINK	71
§ 3. Bereiding van mannuronzuurlacton volgens een eigen methode	72

§ 4. Identificatie van het mannuronzuurlacton	76
§ 5. Bereiding van het vrije mannuronzuur	76
§ 6. Kwantitatieve furfurolbepalingen in polymannuron- zuren, van bariummannuronaat en van mannuron- zuurlacton.	77

HOOFDSTUK IX.

Bereiding en identificatie van fucoïdinezuur	79
§ 1. Bereiding en eigenschappen van fucoïdinezuur . . .	79
§ 2. Oriëntering omtrent de hydrolyseproducten van fucoïdinezuur	81
§ 3. Onderzoek naar de aard van het carbonylzuur, dat bij de hydrolyse van fucoïdinezuur gevormd wordt . .	85

HOOFDSTUK X.

Bereiding van ascorbinezuur	88
§ 1. Bereiding van ascorbinezuur uit sinaasappelen . . .	88
§ 2. Bereiding van ascorbinezuur uit paprika's	89

HOOFDSTUK XI.

Onderzoek naar de aard der polymannuron- zuren A en B	94
§ 1. Aard van de zuurcomponenten der polymannuronzuren A en B	94
§ 2. Methyleering der polymannuronzuren A en B . . .	97
§ 3. Constitutie van de polymannuronzuren A en B . .	101
§ 4. Het aantoonen van kleine hoeveelheden mannose in polymannuronzuur A en van kleine hoeveelheden fucose in polymannuronzuur B	103
§ 5. Reductie van polymannuronzuur B	105
§ 6. Het ontstaan van een anhydro-polymannuronzuur . .	107

HOOFDSTUK XII.

Het verband tusschen de, in de natuur voor- komende, uronzuren en poly-uronzuren eener- zijds en de pentosen en pentosanen anderzijds	112
§ 1. Algemeene opmerkingen over het genetisch verband	112
§ 2. Speciale gevallen, wijzende op het genetisch verband tusschen de uronzuren en poly-uronzuren eenerzijds en de pentosen en pentosanen anderzijds	114

§ 3. Vroegere waarnemingen omtrent de overgang van uronzuren in pentosen en van poly-uronzuren in pentosanen	115
§ 4. Het gedrag van natriumglucuronaat bij koken met verdund zwavelzuur	115
§ 5. Het gedrag van bariumgalacturonaat bij koken met verdunde zuren	117
§ 6. Het gedrag van mannuronzuur ten opzichte van verdund zwavelzuur	120

HOOFDSTUK XIII.

De furfurol- en koolzuurvorming uit uronzuren	125
§ 1. Mogelijkheden voor het verloop der furfurolvorming	125
§ 2. Onderzoek van de eerste mogelijkheid	125
§ 3. Onderzoek van de tweede mogelijkheid	128
§ 4. Onderzoek van de derde mogelijkheid	128
§ 5. De vierde en de vijfde mogelijkheid	131
§ 6. Het verloop der koolzuurvorming uit de uronzuren .	131
§ 7. Onderzoek van de, uit bariumuronaten met waterdamp onder druk verkregen, bariumhoudende preparaten	132
§ 8. Vorming van mierenzuur bij verhitting van bariumgalacturonaat met waterdamp onder druk	137
§ 9. Vorming van een tusschenproduct bij de ontleding van galacturonzuur met verdund zwavelzuur	137
§ 10. De kwantitatieve bepaling van de hoeveelheid koolzuur, gevormd uit de uronzuren	138

HOOFDSTUK XIV.

Reacties op de carboxylgroep van uronzuren en van enkele verwante zuren	140
§ 1. Inleidende opmerkingen	140
§ 2. Reacties der metaalionen met uronzuren en met enkele verwante zuren	144
§ 3. Vorming van complexe verbindingen van uronzuren en van enkele verwante zuren met metalen	148
§ 4. Reacties van uronzuren en van enkele verwante zuren met alkaloiden	152
§ 5. Reacties van uronzuren en van enkele verwante zuren met eenige andere organische basen	157

HOOFDSTUK XV.

Overige reacties van uronzuren en van enkele verwante zuren; kwantitatieve bepalingen. .	160
§ 1. Reacties op de carbonylgroep van de uronzuren en van enkele verwante zuren met aminen	160
§ 2. Gecombineerde reacties op de carbonyl- en carboxyl-groep van de uronzuren met aminen en alkaloiden .	167
§ 3. Kleurreacties op de uronzuren en op enkele verwante zuren	168
§ 4. Het aantoonen der uronzuren in plantaardige producten	172
§ 5. De kwantitatieve koolzuur- en furfurolbepalingen van de uronzuren	174
 SAMENVATTING DER RESULTATEN . . .	 177
LITERATUURLIJST	181
STELLINGEN.	

INLEIDING.

Onder leiding van Prof. Dr. G. v. ITERSON JR. werd dit onderzoek door mij in het laboratorium voor Technische Botanie te Delft verricht.

De uronzuren en enkele daarmee verwante andere carbonylzuren blijken in de natuur een belangrijke physiologische beteekenis te hebben.

De voornaamste bouwsteen van de, in de planten zeer verspreide, pectinestoffen is het galacturonzuur. Vele als hemicellulosen aangeduide wandstoffen blijken uronzuren te bevatten.

Verschillende onderzoekers onderstellen verder, dat de pentosen in de planten uit de overeenkomstige uronzuren gevormd worden, terwijl de uronzuren op hun beurt uit de hexosen ontstaan. Daarmede zou dus een verband tusschen de hexosen en de pentosen in de plantenwereld gelegd zijn.

Voorts zouden uit de pectinestoffen door decarboxyleering hemicellulosen ontstaan.

Het is niet onmogelijk, dat later zal blijken, dat de tetrosen in de plant op overeenkomstige wijze uit de penturonzuren gevormd worden.

Ook bij de overgang van pectine naar lignine zouden, volgens sommige onderzoekers, de uronzuren een rol spelen.

Voorts treffen wij onder de, met de uronzuren verwante, carbonylzuren in de planten, zeer belangrijke producten aan. Zoo zijn b.v. de vitamine C en de plantengroeistof, het auxine-b, carbonyl-oxyzuren.

Wij hebben gemeend een onderzoek naar de, in de planten voorkomende, uronzuren en enkele verwante zuren te moeten instellen, aangezien op dit gebied nog veel terrein braak ligt.

In de eerste hoofdstukken zullen wij uitvoerig de vroegere onderzoekingen over de, in de natuur voorkomende, uronzuren en verwante zuren bespreken.

Wat het onderzoek zelf betreft, hebben wij ons in de eerste plaats

ten doel gesteld de poly-uronzuren, de uronzuren en de daarmee verwante zuren, zoals vitamine C en fucoïdinezuur, uit plantaardige producten te bereiden.

Daarna werd een onderzoek ingesteld naar de onbekende constituties van de polymannuronzuren en van het fucoïdinezuur.

Vervolgens hebben wij de onderstelde vorming der pentosen in de planten door decarboxyleering der uronzuren met de zuivere uronzuren langs chemische weg trachten na te bootsen.

Eveneens werd nagegaan, of het polymannuronzuur op analoge wijze geheel of gedeeltelijk gedecarboxyleerd zou kunnen worden. In dit geval zou volgens de gebruikelijke opvatting, een hemicellulose of een poly-uronide gevormd worden.

In hoofdstuk XIII is beschreven, hoe het verloop der furfurol- en koolzuurvorming uit de uronzuren is nagegaan. Op deze furfurol- en koolzuurvorming zijn n.l. kwantitatieve bepalingen gebaseerd. De furfurolbepaling is een empirische bepaling en de koolzuurbepaling verloopt evenmin kwantitatief, zoodat een onderzoek naar het verloop dezer reacties gewenscht was.

Ten slotte hebben wij in de beide laatste hoofdstukken beschreven, hoe de reacties op de uronzuren en op de verwante zuren nagegaan werden. De belangrijke rol, die de carbonylzuren in de natuur spelen, maakte een gemakkelijke identificatie der zuren wenschelijk. Wel was op galacturonzuur door F. EHRLICH sinds korte tijd een reactie gevonden, waarmee wij het zuur op eenvoudige wijze in plantenproducten aan konden toonen, maar van geen der andere uronzuren of verwante zuren was een dergelijke reactie bekend.

HOOFDSTUK I.

Vroegere onderzoekingen over glucuronzuur.

§ 1. Vorming, bereiding en eigenschappen van glucuronzuur.

Het glucuronzuur werd in 1878 gelijktijdig door M. JAFFÉ (109) en door O. SCHMIEDEBERG en H. MEYER (216) ontdekt. Het zuur werd in de urine van honden, die kampher in hun voedsel kregen, als kamphoglucuronzuur gevonden. Bij hydrolyse van het kamphoglucuronzuur werd een kristallijn zuur met de formule $C_6H_8O_6$ verkregen.

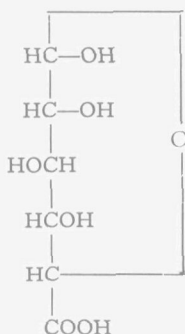
Het zuur reduceerde FEHLING's proefvocht en draaide het polarisatievlak naar rechts. Uit de oxydatieproeven bleek, dat een aromatische kern uitgesloten was. SCHMIEDEBERG en MEYER twijfelden er niet aan of het zuur was een derivaat van glucose, vandaar de door hen aan het zuur gegeven naam van glucuronzuur. Zij hadden bij deze werkwijze echter niet het vrije zuur, doch het lacton geïsoleerd.

Hun opvatting werd bevestigd door de proefnemingen van H. THIERFELDER (249), die bewees, dat het zuur bij oxydatie in suikerzuur en bij reductie in gulonzuur overging.

Een volgend bewijs werd door E. FISCHER en O. PILOTY (66) geleverd. Zij verkregen het zuur synthetisch door reductie van slijmzuur.

Het glucuronzuur werd pas in 1925 door F. EHRLICH (49) kristallijn afgescheiden. Bovendien constateerde hij een stijgende mutarotatie. Deze mutarotatie wijst op een ringsluiting. In dit geval neemt W. N. HAWORTH (92), evenals voor glucose, een amyleenoxyde-ring aan, m. a. w. een zuurstofbrug tusschen het koolstofatoom van de aldehydegroep en het vijfde koolstofatoom.

Uit de hierbovengenoemde resultaten volgde, dat aan het glucuronzuur de volgende structuurformule toegewezen moet worden.



Formule van d-glucuronzuur.

De vraag was nu, op welke wijze het glucuronzuur in het dierlijke lichaam gevormd werd.

De nauwe verwantschap van glucuronzuur met glucose deed al dadelijk de vorming van glucuronzuur uit deze suiker onderstellen. Ten einde de juistheid van deze onderstelling na te gaan, hebben verschillende onderzoekers de oxydatie van glucose tot glucuronzuur trachten uit te voeren.

H. KILIANI (118) vermoedde oorspronkelijk, dat hij het zuur bij oxydatie van glucose met salpeterzuur verkregen had. Bij nader onderzoek bleek hem echter, dat bij deze proef geen glucuronzuur, doch l-sorburonzuur (5-keto-gluconzuur) ontstaan was.

A. JOLLES (111) beweert, dat bij oxydatie van glucose met waterstofperoxyde bij 37° C. glucuronzuur in kleine hoeveelheden zou ontstaan.

Meer voor de hand liggende methoden hebben M. BERGMANN, W. WALTER WOLFF (17) en K. SMOLENSKI (233) toegepast. Zij hebben het glucuronzuur verkregen door oxydatie van glucose, waarvan de aldehydegroep beschermd was.

BERGMANN en WALTER WOLFF hebben daartoe α -mentholglucosied met een alkalische broomoplossing geoxydeerd en uit het oxydatieproduct hebben zij door hydrolyse het glucuronzuur verkregen.

Eenzoo verkreeg SMOLENSKI methylglucuronzuur bij oxydatie van methylglucosied met waterstofperoxyde, in tegenwoordigheid van ferri-ionen als katalysator.

Ook in cellulose zijn de aldehydegroepen der glucose-eenheden beschermd. Bij oxydatie van, in koperoxyde-ammoniak opgeloste, cellulose met kaliumpermanganaat, werd een product gevormd, dat

bij hydrolyse o. a. glucuronzuur gaf, dat als cinchoninezout geïdentificeerd werd (112).

Het voorkomen van glucuronzuur in oxycellulose werd reeds in 1899 door O. FABER en B. TOLLENS (63) waarschijnlijk geacht.

E. FISCHER onderstelde, dat het glucuronzuur in het dierlijke lichaam eveneens gevormd zou worden uit glucose, waarvan de aldehyde-groep beschermd is. Deze hypothese is sindsdien talrijke malen bevestigd (zie § 2). De voor het dierlijke lichaam giftige stoffen, zooals menthol en borneol, worden door een glucosied-binding aan glucose onschadelijk gemaakt, waarna oxydatie van het gevormde glucosied tot een gepaard glucuronzuur plaats vindt, dat als zoodanig het lichaam in de urine verlaat.

De oorspronkelijke bereidingswijzen van glucuronzuur berustten alle op de isoleering van zulk een gepaard glucuronzuur uit de urine en een daarop volgende hydrolyse van dit gepaarde zuur tot glucuronzuur.

Voor de isoleering der gepaarde uronzuren uit de urine zijn twee methoden in gebruik. De eerste methode is van E. KÜLZ (125) afkomstig en berust op de oplosbaarheid der gepaarde uronzuren in een alcohol-aether-mengsel. De urine wordt op het waterbad ingedampd en de vloeistof met zwavelzuur aangezuurd. Deze oplossing wordt zoovele malen met een mengsel van 2 deelen aether op 1 deel 96%-ige alcohol uitgeschud, tot geen optisch actieve stoffen meer in oplossing gaan. Het alcohol-aether-extract wordt vervolgens ingedampd, waarna het gepaarde uronzuur uit de oplossing als een gekristalliseerd alkaloïde- of metaalzout wordt afgescheiden.

De tweede methode is afkomstig van O. SCHMIEDEBERG en H. MEIJER (216). Volgens deze methode wordt aan de geneutraliseerde urine, die het gepaarde uronzuur bevat, loodacetaat toegevoegd. Uit het filtraat wordt vervolgens met basisch loodacetaat het gepaarde uronzuur geprecipiteerd.

De, voor de bereiding, veel gebruikte gepaarde uronzuren zijn mentholglucuronzuur (179), borneolglucuronzuur (72) en euxanthinezuur (zie hoofdstuk V).

De gepaarde uronzuren worden vervolgens bij $\pm 100^{\circ}$ C., of bij een hoogere temperatuur, door hydrolyse in een zwak zuur milieu, in de componenten gesplitst.

De voorgaande bereidingsmethoden gaven dus over de dierlijke

uitscheidingsproducten zuiver glucuronzuur, dat als lacton, of als vrij zuur, kristallijn geïsoleerd werd.

Sinds korte tijd is het ook gelukt om glucuronzuur uit plantaardige stoffen kristallijn te verkrijgen. F. WEINMANN (264, 265) heeft methoden uitgewerkt om het glucuronzuur kristallijn uit verschillende gommen, in het bijzonder uit arabische gom, te bereiden. Wij komen hierop nog terug.

De fysische en chemische eigenschappen van het glucuronzuur zijn de volgende:

De glucuronzuurkristallen bestaan, na omkristallisatie uit alcohol of aethylacetaat, uit monokliene witte naaldjes, die bij 156° C. smelten. In waterige oplossing vertoont het zuur mutarotatie.

$$[\alpha]_D = + 11,73^\circ \rightarrow + 36,26^\circ.$$

Wanneer glucuronzuur uit een alcoholische oplossing met aether in amorfe toestand geprecipiteerd wordt, vertoont het product geen mutarotatie (49). Klaarblijkelijk wordt in dit geval het mengsel van α - en β -glucuronzuur, zooals dit in de oplossing aanwezig is, als zoodanig geprecipiteerd.

Een waterige oplossing van glucuronzuur staat bij gewone temperatuur langzaam en bij verwarming sneller water af en geeft het lacton tot een bepaald evenwicht tusschen het zuur en het lacton bereikt is. In waterige oplossing ligt dit evenwicht bij 60% zuur en 40% lacton.

Het lacton van glucuronzuur (glucuron genaamd) vormt monokliene kristallen met een smeltpunt van 176° C. (234). De polarisatie van het lacton bedraagt + 19,2° (249, 250).

Behalve de algemeene reacties op de uronzuren (zie hoofdstuk XIV en XV) zijn nog eenige reacties op glucuronzuur in de literatuur beschreven.

Glucuronzuur geeft met carbazol en zwavelzuur een lila tot roode kleur (45).

Bij oxydatie van glucuronzuur ontstaat suikerzuur, dat als zuur-kaliumzout aange- toond kan worden (reactie van Gans-Tollens).

Behalve deze kwalitatieve reacties zijn er ook nog eenige kwantitatieve bepalingen voor glucuronzuur beschreven:

a. Een colorimetrische bepaling met naphtoresorcine (190).

b. In de urine kan glucuronzuur direct bepaald worden volgens de reductiemethode van SHAFFER-HARTMANN voor glucose (199, 214).

De hierboven genoemde reacties (behalve de reactie van Gans-Tollens) en bepalingen zijn niet karakteristiek voor glucuronzuur, doch kunnen ook voor de overige uron- zuren worden toegepast. Voor de laatste zijn de beste uitvoeringswijzen echter nog niet vastgesteld.

In de volgende paragrafen zullen wij het voorkomen van glucuronzuur in de natuur bespreken. Het glucuronzuur komt in de natuur voor:

- a. als uitscheidingsproduct van het dierlijke en menselijke lichaam;
- b. als bestanddeel van het dierlijke lichaam;
- c. in plantenproducten.

§ 2. Het voorkomen van glucuronzuur als uitscheidingsproduct van het dierlijke lichaam.

Zeer algemeen komt het glucuronzuur voor als een product van de normale menselijke en dierlijke stofwisseling (154, 255). P. MEYER en C. NEUBERG toonden het zuur in de urine van normale mensen aan, waarin het steeds in kleine hoeveelheden aan phenolen, zooals kresol, gebonden voorkomt.

Een zeer groot aantal gevallen zijn echter bekend van kunstmatig geschapen glucuronzuurafscheiding bij dieren.

Zooals reeds hiervóór is opgemerkt worden voor het lichaam schadelijke stoffen in de urine aan glucuronzuur gekoppeld, teruggevonden. Het glucuronzuur komt dan ook nooit vrij, doch steeds in gebonden toestand in de urine voor. Het feit, dat juist een groot aantal stoffen tot een glucuronzuurafscheiding aanleiding geven, heeft de opvatting doen postvatten, dat de glucuronzuurkoppeling een chemische beschermingsmaatregel van het organisme is (180).

Bij voeding van gepaarde glucuronzuren aan dieren ondergaan deze in het lichaam geen verandering. Phenolglucuronzuur passeerde het dierlijke lichaam, zonder dat het gebonden phenol een schadelijke inwerking uitoefende (125).

Ook bij voeding of injectie van dieren met glucuronzuur, zonder toevoeging van schadelijke stoffen, wordt het zuur als zoodanig afgescheiden (19). Er zijn een zeer groot aantal substanties, die een glucuronzuurafscheiding te voorschijn roepen. Voor een overzicht verwijs ik naar eenige samenvattingen in de literatuur (1, 2, 3, 180). Ook in de laatste tijd werden nog vele onderzoekingen op dit gebied verricht, vooral door A. J. QUICK.

Wat de chemische binding van glucuronzuur met zijn paarling betreft, zijn er twee gevallen te onderscheiden. De daarbij gevormde

verbindingen kunnen worden ingedeeld in de *aetherklasse* en de *esterklasse*.

De eerstgenoemde aether- of glucosiedklasse is verreweg de belangrijkste. Voor verbindingen uit deze klasse neemt men (66, 177) een glucosiedbinding van glucuronzuur met zijn paarling aan. Alle gepaarde glucuronzuren van deze groep zullen bij hydrolyse naast glucuronzuur een product geven, dat een hydroxylgroep in het molecuul draagt. Bij toedienen in het voedsel van nog nader te bespreken schadelijke stoffen, die een hydroxylgroep bevatten, kan in het dierlijke lichaam dus gemakkelijk een gepaard uronzuur gevormd worden.

Verder nog te bespreken schadelijke stoffen, die geen hydroxylgroep bevatten, worden in het dierlijke lichaam eerst omgezet in producten met een hydroxylgroep, welke producten dan met glucuronzuur gepaard het lichaam verlaten. Zoo wordt in het dierlijke lichaam b.v. benzol tot phenol, naphthaline tot naphтол en aniline tot aminophenol geoxydeerd, welke geoxydeerde producten dan een koppeling met glucose ondergaan.

Aan de andere kant kan in het dierlijke lichaam van schadelijke stoffen, die geen hydroxylgroep, doch wel een carbonylgroep bevatten, deze laatste groep tot een hydroxylgroep worden gereduceerd.

De meeste verbindingen der aetherklasse draaien het polarisatievlak naar links en reduceeren FEHLING's proefvocht niet.

Voor een groot aantal stoffen heeft men de koppeling bewezen, doch men heeft slechts een klein aantal dezer gepaarde glucuronzuren in zuivere toestand kunnen bereiden.

De voornaamste vertegenwoordigers der aetherklasse zijn:

a. *Mentholglucuronzuur* (18, 220). Na toedienen van mentholhoudend voedsel aan konijnen, komt het mentholglucuronzuur in de urine van deze dieren voor (198). Het is een, in alcohol en aether gemakkelijk oplosbaar, in koud water moeilijk oplosbaar zuur.

b. *Kamphoglucuronzuur*. Bij het toedienen van kampher aan het voedsel van honden heeft er een afscheiding van kamphoglucuronzuur in de urine plaats, zooals reeds in § 1 is opgemerkt (33, 89, 146, 156, 216). Over de samenstelling van dit gepaarde glucuronzuur bestaat verschil van meening.

Oudere onderzoekers, zooals O. SCHMIEDEBERG, H. MEYER en A. MAGNUS-LEVY, geven aan de verbinding de naam van kamphoglucuronzuur en onderscheiden bovendien d- en l-kamphoglucuronzuur. Daarentegen spreekt M. ISHIDATE (108) van p-oxykampherglucuronzuur. Deze onderzoeker geeft echter in het geciteerde stuk de structuurformule niet weer.

In elk geval is de carbonylgroep van het kampher niet gereduceerd, daar het gepaarde uronzuur niet identiek is met borneolglucuronzuur. Waarschijnlijk wordt het kampher in het dierlijke lichaam omgezet in een product met een hydroxylgroep.

c. *Borneolglucuronzuur*. Door het toedienen van borneolbevattend voedsel aan honden vormt zich borneolglucuronzuur, dat als zinkzout uit de urine afgescheiden kan worden (87, 146, 201).

J. PRYDE en R. T. WILLIAMS (196) hebben de structuur van het zuur bepaald door de verbinding te methyleeren, het gemethyleerde product te hydrolyseeren, de gevormde hydrolyseproducten te oxydeeren en deze oxydatieproducten nader te onderzoeken. Het glucuronzuur heeft in de gepaarde verbinding een pyranose-structuur.

d. *Thymolglucuronzuur*. Thymol wordt in het lichaam van mensch of dier in thymolglucuronzuur omgezet (88).

De tweede klasse der gepaarde glucuronzuren is die der *esters*. De representanten van deze groep zijn veel minder bestendig dan die der groep der *aethers*. De tot de tweede groep behorende gepaarde glucuronzuren reduceeren FEHLING's proefvocht zonder voorafgaande hydrolyse. De meeste verbindingen dezer groep draaien het polarisatievlak naar rechts. De eerste, tot deze klasse behorende verbinding, het dimethylaminobenzoëglucuronzuur, werd in 1904 door M. JAFFÉ (110) ontdekt.

De voornaamste vertegenwoordiger is het *benzoëglucuronzuur*. Het wordt verkregen uit de urine van met benzoëzuur gevoede honden (147, 202). A. MAGNUS-LEVY (147) neemt voor de ester een binding tusschen de hydroxylgroep van het eerste koolstofatoom van glucuronzuur met de carboxylgroep van benzoëzuur aan.

De ester vertoont echter mutarotatie en is in staat om cyaanwaterstof te addeeren. A. J. QUICK (200) neemt dan ook een vrije aldehydegroep in de ester aan. Volgens deze onderzoeker vindt de binding van de beide componenten tusschen de carboxylgroep van benzoëzuur en de hydroxylgroep aan het tweede koolstofatoom van glucuronzuur plaats.

§ 3. Het voorkomen van glucuronzuur als bestanddeel van het dierlijke lichaam.

Glucuronzuur komt voor in het *bloed* (235, 155). In het bloed van menschen, die aan suikerziekte lijden, komt veel minder glucuronzuur voor dan bij gezonde menschen (237, 238).

Als bestanddeelen van bepaalde weefsels van het dierlijke organisme, die glucuronzuur bevatten, moeten verder *chondroïtinezwavelzuur* (217) en *mucoïtinezwavelzuur* genoemd worden. Het chondroïtinezwavelzuur komt in het dierlijke organisme in het kraakbeen en in de vaatwanden der slagaderen voor. Het mucoïtinezwavelzuur wordt o.a. in de maagslijmhuud aangetroffen.

Het chondroïtinezwavelzuur bestaat uit 2 moleculen glucuronzuur, die elk door een glucosiedbinding aan een molecuul geacetyleerd galactosamine verbonden zijn. Zwavelzuur is met deze aminosuiker veresterd en wel aan de hydroxylgroepen van het zesde koolstof-atoom der galactosecomponenten (135).

Mucoïtinezwavelzuur is op analoge wijze opgebouwd, doch bevat glucose, inplaats van galactose, als suikercomponent (137).

§ 4. Het voorkomen van glucuronzuur in plantenproducten.

Het glucuronzuur komt zeer verbreid in de plantenwereld voor. Zoals wij hierna zullen zien, wordt het bij vertegenwoordigers van de meest uiteenlopende plantenfamilies aangetroffen. Het zuur komt zelden in vrije toestand, doch meestal als condensatieproduct met suikers of niet-suikers voor.

A. D. DICKSON, H. OTTERSON en K. P. LINK (44) troffen het glucuronzuur echter als vrij zuur in maiskiemen aan.

Gebonden aan niet-suikers komt het vaak in de saponinen voor. De natuurlijke condensatieproducten van glucuronzuur met de suikers behooren voor het grootste gedeelte tot de groep der hemicellulosen. Andere onderzoekers geven er de voorkeur aan deze condensatieproducten van glucuronzuur en suikers met een aparte naam aan te duiden. E. J. CANDLIN (29) heeft namelijk de naam „poly-uroniden” voorgesteld.

Het komt ons wenschelijk voor, de groepnaam hemicellulosen aan te houden. De hemicellulosen zouden in dit geval in 2 groepen onderverdeeld worden, n.l. in hemicellulosen, die bij hydrolyse uitsluitend suikers geven, z.g. „ware hemicellulosen”, en in hemicellulosen, die bij hydrolyse suikers en uronzuren opleveren, z.g. poly-uroniden.

Voor de condensatieproducten van glucuronzuur met suikers is kenmerkend, dat deze suikers veelal glucose en xylose zijn. Het veelvuldig samengaan van glucuronzuur met deze beide suikers heeft tot de opvatting geleid, dat glucuronzuur in nauw genetisch verband met deze suikers staat. Deze opvatting vinden wij in hoofdstuk XII nader uitgewerkt.

De condensatieproducten met suikers worden ook in vele plantengommen en plantenslijmen aangetroffen. Verschillende dezer planten-

gommen zijn door F. WEINMANN, E. ANDERSON e.a. grondig onderzocht.

WEINMANN heeft het glucuronzuur kristallijn bereid uit arabische gom, gezirehgom en kersengom. ANDERSON heeft, zooals wij zullen zien, de samenstelling van het mesquite gom opgehelderd.

Het glucuronzuur is niet alleen in levend plantenmateriaal, doch is ook in afgestorven plantendeelen aangetroffen.

J. MARCUSSON (151) heeft het glucuronzuur bijvoorbeeld naast huminezuren, lignine en cellulose in de *bruinkolen* aan kunnen toonen.

Rogge- en tarwestroo bleken, volgens C. G. SCHWALBE en G. A. FELDTMANN (225), ruim 4% glucuronzuur te bevatten.

Wij zullen thans een overzicht geven van de, in de literatuur vermelde, voorbeelden van het voorkomen van glucuronzuur als plantenbestanddeel, waarbij wij tevens de, naast het glucuronzuur, aanwezige suikers vermeld hebben, daar deze in nauw genetisch verband staan met de uronzuren. Hierbij moet echter opgemerkt worden, dat in sommige gevallen de identificatie van het glucuronzuur onvoldoende was. Vooral in de oudere literatuur treft men n.l. gevallen aan, waarin het voorkomen van glucuronzuur als vaststaand beschouwd werd, indien de naphtoresorcine-reactie positief uitviel. Dit hing hiermede samen, dat het galacturonzuur en het mannuronzuur destijds nog onbekend waren.

Allereerst zullen wij het voorkomen der uronzuren als bestanddeel, of als uitscheidingsproduct, van micro-organismen aangeven.

Volgens E. W. HOPKINS, W. H. PETERSON en E. B. FRED (106) bevat de gom, die bepaalde wortelknolbacteriën afscheiden, waarschijnlijk glucuronzuur.

Ook onder de stofwisselingsproducten van andere bacteriën kon in sommige gevallen glucuronzuur worden aangetoond.

Verder komt het glucuronzuur voor in de oplosbare polysacchariedbestanddeelen van bepaalde micro-organismen.

W. F. GOEBEL (71) heeft bij de hydrolyse van de polysacchariedbestanddeelen van Friedlander Bacillus Type A twee aldobionzuren kunnen isoleren, die hij *aldobionzuur-1* en *aldobionzuur-2* noemt. Bij hydrolyse van het polysaccharied met 5%-ig zwavelzuur verkreeg hij glucose, aldobionzuur en een neutrale verbinding, die volgens GOEBEL waarschijnlijk het lacton van aldobionzuur-2 voorstelt. Uit de oplossing werd het aldobionzuur-1 als calciumzout door methylalcohol geprecipiteerd. De beide andere componenten blijven daarbij in oplossing. Uit het filtraat werd, na vergisting der glucose, het aldobionzuur-2 als basisch loodzout geïsoleerd.

Het aldobionzuur-1 van GOEBEL geeft een sterke naphtoresorcine-reactie. Bij hydrolyse ontstaat glucose en glucuronzuur. Dit laatste zuur heeft GOEBEL niet kristallijn afgescheiden, doch bij oxydatie kon hij suikerzuur aantonen. Bij oxydatie van het aldobionzuur zelf werd een verbinding van glucuronzuur en gluconzuur gevormd.

Hieruit volgt, dat de aldehydegroep van het glucuronzuur in het aldobionzuur beschermd is. Het aldobionzuur-1 van GOEBEL moet dus als een glucosied van glucose en glucuronzuur opgevat worden.

Het aldobionzuur-2 van GOEBEL is verschillend van het eerste aldobionzuur, daar het aldobionzuur-2 geen naphtoresorcine-reactie geeft.

M. HEIDELBERGER en O. T. AVERY (95) hebben waarschijnlijk gemaakt, dat het oplosbare polysaccharied van *Pneumococcus* Type III glucuronzuur bevat.

M. HEIDELBERGER en W. F. GOEBEL (96) hebben het polysaccharied met 75%-ig zwavelzuur bij 0° C. gedurende een nacht behandeld en vervolgens 5 uren met 3%-ig zwavelzuur gekookt. Het, bij de hydrolyse vrijgekomen, aldobionzuur hebben zij als calciumzout afgescheiden. Bij hydrolyse van dit aldobionzuur wordt glucose en glucuronzuur gevormd. Bij oxydatie van het aldobionzuur ontstaat glucuronzure gluconzuur. Dit aldobionzuur, dat van de beide hiervoor genoemde aldobionzuren verschilt, moet ook als een ander glucosied van glucose en glucuronzuur opgevat worden.

Familie: *Gramineae*.

Bambusa spec. div. (Bamboe) — S. KOMATSU en Y. SASAOKA (122) hebben in het perssap van bamboeloten o.m. glucuronzuur, glucose, xylose en een andere, niet geïdentificeerde, suiker gevonden.

Hordeum vulgare L. (Gerst) — W. PALLADIN en W. LEWTSCHENKO (193) hebben in het aetherextract van gerst glucuronzuur aangetoond.

Familie: *Fagaceae*.

Fagus silvatica L. (Beuk) — M. H. O'DWYER (188) heeft uit beukenhout twee hemicellulosen (poly-uroniden) A en B kunnen isoleren. Bij aanzuren van het extract, dat zij verkreeg bij de behandeling van beukenhout met 4%-ige loog, sloeg de hemicellulose (poly-uronide) A neer. In het filtraat was de hemicellulose B nog opgelost. Deze werd door toevoeging van alcohol uit de oplossing neergeslagen.

De hemicellulose (poly-uronide) A gaf bij hydrolyse xylose en glucuronzuur en de hemicellulose B gaf bij hydrolyse arabinose en galacturonzuur.

Familie: *Moraceae*.

Cannabis sativa L. (Hennep) — Volgens P. A. LEVENE (134) zou de phytine, die hij, na extractie van hennepmeel met een 5%-ige natriumchloride-oplossing, uit de extractievloeistof met koperchloride neersloeg, in twee fracties te scheiden zijn.

Een dezer fracties zou volgens hem uit glucuronzuur en fosforzuur bestaan. Hij heeft de aanwezigheid van glucuronzuur slechts aan de kleurreactie met naphtoresorcine getoetst.

C. NEUBERG (178) heeft deze waarneming niet kunnen bevestigen.

Familie: *Chenopodiaceae*.

Beta vulgaris L. (Suikerbiet) — In de suikerbiet vond ANDRLICK het bietenharszuur, dat volgens K. SMOLENSKI (232a) als glucuronoïde aanwezig zou zijn. Door zoutzuur wordt deze moederstof in glucuronzuur en bietenharszuur gesplitst.

K. REHORST (203) kon het glucuronzuurlacton in kristallijne toestand uit genoemde stof isoleren.

Chenopodium Quinoa WILLD. — Uit het kruid heeft M. GONNERMANN (75) met alkali een zuur-saponine geëxtraheerd, dat hij uit het extract met zoutzuur neersloeg. In het saponine kon hij glucuronzuur aantoonen.

Familie: *Caryophyllaceae*.

Agrostemma Githago L. (Bolderik) — Uit het zaad van de bolderik hebben E. WEDEKIND en KRECKE een saponine geïsoleerd, dat bij hydrolyse o.m. glucuronzuur gaf.

Familie: *Cruciferae*.

Brassica oleracea L. var. *sabauda* (Savoye kool) — E. BUSOLT (25) heeft in de bladeren van savoye kool glucuronzuur, glucose, fructose en manniet aangetoond.

Familie: *Rosaceae*.

Quillaja Saponaria MOLINA (zeephout) — Uit de schors van de *Quillaja Saponaria* MOLINA kan een saponine geïsoleerd worden, dat bij krachtige hydrolyse glucuronzuur of galacturonzuur afsplitst (267).

Prunus Cerasus L. (Kers) — Uit de gom, die deze boom afscheidt, heeft F. WEINMANN het glucuronzuur in kristallijne toestand bereid.

Familie: *Leguminosae*.

Glycyrrhiza glabra L. (Zoethout) — A. TSCHIRCH, H. CEDERBERG en S. GAUCHMANN (257, 258, 259) zijn de eersten, die glucuronzuur in plantaardige producten met zekerheid aangetoond hebben. Zij hebben het zuur uit zoethout bereid. Het glucuronzuur is in het zoethout aanwezig als het calciummagnesiumzout van glycyrrhizinezuur.

Glycyrrhizinezuur moet als de diglucuronzure aether van glycyrrhetinezuur opgevat worden.

Acacia Senegal (L.) WILLD. — Uit de gom, die deze boom afscheidt, de arabische gom, heeft F. WEINMANN (264, 265) glucuronzuur in kristallijne toestand bereid. Bij partiele hydrolyse werd een aldobionzuur verkregen, dat uit 1 aequivalent glucuronzuur op 1 aequivalent galactose was samengesteld.

Acacia arabica WILLD. — Deze boomen scheiden de gezirehgom af. F. WEINMANN (265) heeft uit deze gom glucuronzuur kristallijn bereid.

Pisum sativum L. (Erwt) — E. BUSOLT (25) toonde in het waterextract van groene erwten glucuronzuur, glucose, laevulose en manniet aan.

Familie: *Linaceae*.

Linum usitatissimum L. (Vlas) — Glucuronzuur komt volgens E. SCHMIDT (221) als polyglucuronzuur in de celwanden voor.

Familie: *Anacardiaceae*.

Pistacia Lentiscus L. — De, van deze boom afkomstige, mesquite-gom is door E. ANDERSON en L. OTIS (7) onderzocht. De gom is een anorganisch zout van een organisch zuur, dat samengesteld is uit 4 moleculen arabinose, 3 moleculen galactose en 1 molecuul methoxy-glucuronzuur.

Familie: *Hippocastanaceae*.

Aesculus Hippocastanum L. (Paardekastanje) — A. W. v. D. HAAR (84) isoleerde een kastanjesaponine en vond bij de hydrolyse daarvan: Glucuronzuur, glucose, galactose, een pentose en een methylpentose.

Familie: *Malvaceae*.

Gossypium spec. div. (Katoen) — E. ANDERSON en S. KINSMAN (8) hebben uit katoenzaadhuidjes een hemicellulose (poly-uronide) geïsoleerd, die voor 74% uit xylose en voor 9,7% uit glucuronzuur bestaat. Het glucuronzuur is in de hemicellulose aanwezig als een aldobionzuur, dat uit 1 mol. xylose op 1 mol. glucuronzuur opgebouwd is.

Familie: *Theaceae*.

Camellia Sasanqua THB. — S. AOYAMA (10, 11) heeft uit de *Camellia Sasanqua* het sasanqua-saponine geïsoleerd, dat bij hydrolyse sasanquaprosapogenine ($C_{50}H_{80}O_{14}$), galactose en een onbekende stof van de formule $C_5H_{10}O_5$ gaf. Het sasanquaprosapogenine gaf bij hydrolyse glucuronzuur.

Camellia sinensis (L.) O. KTZE (Thee). — AOYAMA heeft uit de zaden dezer plant een saponine geïsoleerd, dat hij theasaponine genoemd heeft. Bij hydrolyse van dit saponine met 4%-ig zwavelzuur gedurende 4 uren kreeg hij: Arabinose, galactose, glucose en theaprosapogenine. Bij hydrolyse van dit sapogenine met zuren op 150° C. verkreeg hij glucuronzuur en eindsapogenine.

Familie: *Araliaceae*.

Panax repens MAXIM. — AOYAMA (9) heeft uit *Panax repens* MAXIM. een saponine geïsoleerd, dat bij hydrolyse o.a. glucuronzuur, glucose en arabinose gaf.

Aralia chinensis L. var. *glabrescens* — S. KUWATA (127, 128) heeft uit de schors van *Aralia chinensis* L. een saponineachtig glucosied geïsoleerd, dat bij hydrolyse o.m. glucuronzuur opleverde.

Familie: *Styracaceae*.

Styrax japonicum SIEB. ET ZUCC. — In de vruchtwanden komt een saponine voor, dat bij hydrolyse glucuronzuur en glucose geeft (152).

Familie: *Labiatae*.

Scutellaria baicalensis GEORGI. — K. SHIBATA en medewerkers (226) hebben uit de wortel van *Scutellaria baicalensis* GEORGI baicaline geïsoleerd. Baicaline is een flavonglucuronzuurverbinding.

Scutellaria altissima L. — GOLDSCHMIEDT, MOLISCH en ZERNER (73, 164) hebben uit de bladeren van *Scutellaria altissima* L. scutellarine, een flavonglucuronzuurverbinding, geïsoleerd.

Behalve *S. altissima* L. bevatten talrijke andere vertegenwoordigers van deze familie de genoemde flavonglucuronzuurverbinding, zoals *S. indica* L., *S. alpina* L., *S. hastaefolia* L., *S. japonica* M. ET DEC. en andere.

Familie: *Cucurbitaceae*.

Cucumis Melo L. (Meloen) — W. PALLADIN en W. LEWTSCHENKO (193) hebben een uronzuur, dat waarschijnlijk glucuronzuur is, in het aether-extract van een meloen met de naphtoresorcine-reactie aangetoond.

Familie: *Compositae*.

Taraxacum officinale WEBER (Paardebloem) — In de jonge bladeren van de paardebloem kon W. PALLADIN (193) de aanwezigheid van glucuronzuur waarschijnlijk maken.

HOOFDSTUK II.

Vroegere onderzoekingen over galacturonzuur.

§ 1. Identificatie, bereiding en eigenschappen van galacturonzuur.

Het galacturonzuur werd in 1917 gelijktijdig door M. L. SUAREZ (239) in citroenpectine en door F. EHRLICH (47) in suikerbietenpectine ontdekt. SUAREZ isoleerde uit het perssap van citroenen een zuur als bariumzout. Dit bariumzout gaf de naphtoresorcine-, de phloroglucine- en de orcine-reactie. Bij oxydatie van het zure product werd slijmzuur gevormd. Oorspronkelijk noemde SUAREZ het zuur „actief aldehydslijmzuur”. Evenzoo isoleerde F. EHRLICH uit bietenpulp een zuur, dat bij oxydatie slijmzuur gaf.

Reeds lang vóór deze ontdekking had B. TOLLENS (254) er op gewezen, dat in de pectinestoffen, naast galactose en arabinose, koolhydraatachtige stoffen met één of meer carboxylgroepen aanwezig moesten zijn. Deze conclusie trok hij uit de resultaten zijner elementairanalyses van uit verschillende materialen bereide, porties van pectinestoffen, waarbij hij meer zuurstof vond, dan met de uitsluitende aanwezigheid van koolhydraten overeenkwam.

Vóór de ontdekking van het galacturonzuur in het plantenrijk, had E. FISCHER (67, 68) reeds in 1890 verkondigd, dat bij de reductie van slijmzuur tot galactonzuur het racemische mengsel van aldehydslijmzuur zou ontstaan.

Deze onderstelling baseerde hij op de waarneming, dat bij reductie van slijmzuur, dat zelf FEHLING's proefvocht niet reduceerde, een product gevormd werd, dat FEHLING's proefvocht wél reduceerde. Deze reductie van FEHLING's proefvocht neemt, bij verdere reductie van het slijmzuur, toe tot een bepaald maximum en neemt daarna weer af.

In 1908 deelden J. A. MANDEL en C. NEUBERG (148) mede, dat het aldehydslijmzuur van FISCHER de naphtoresorcine-reactie van TOLLENS gaf.

Het gelukte eerst onlangs C. NIEMANN en K. P. LINK (185) dit

racemische mengsel van aldehydslijmzuur, tegenwoordig d-1-galacturonzuur genoemd, kristallijn af te scheiden. Bij reductie van het monolacton van slijmzuur, in zwak zuur milieu, met natrium-amalgaam, werd het d-1-galacturonzuur gevormd, dat als bariumzout geïsoleerd werd. Uit dat bariumzout werd het vrije zuur kristallijn verkregen.

H. OHLE en G. BEREND (190a) en later ook C. NIEMANN en K. P. LINK (187) hebben d-galacturonzuur synthetisch bereid door diacetongalactose met kaliumpermanganaat te oxydeeren en vervolgens de acetongroepen met zwavelzuur af te splitsen. H. OHLE en G. BEREND hebben het zuur geïdentificeerd aan de smeltpunten van het brucinezout (189° C.) en van het phenylhydrazide van het phenylosazon (140° C.).

Het d-galacturonzuur is rechtsdraaiend en vertoont een positieve mutarotatie.

In verband met de hierboven genoemde resultaten wordt voor het galacturonzuur de hieronder weergegeven structuurformule aangenomen.



Formule van d-galacturonzuur.

Als uitgangsmateriaal voor de bereiding van galacturonzuur wordt pectine gebruikt. Oorspronkelijk gaf F. EHRLICH (50), die zijn proefnemingen in hoofdzaak met suikerbietenpectine verrichtte, als bereidingswijze van galacturonzuur aan: 10 uren hydrolyseeren der pectine met 2%-ig zwavelzuur en een daaropvolgende neutralisatie der oplossing met bariumcarbonaat. Uit deze oplossing wordt het bariumgalacturonaat met alcohol afgescheiden en vervolgens wordt uit dit bariumzout het galacturonzuur bereid. Deze methode geeft

echter, zooals wij in hoofdstuk VI zullen zien, onbevredigende resultaten.

In een latere publicatie (54) beveelt EHRLICH als uitgangproduct het, uit pectine bereide, tetragalacturonzuur *a* of *c* (zie § 2) aan. De hydrolyse van het tetragalacturonzuur geschiedt het beste door dit met 1%-ig zwavelzuur gedurende 15—20 minuten in een autoclaaf op 145—150° C. te verhitten, waarna het zwavelzuur met een verzadigde barietoplossing geneutraliseerd wordt. Bij het indampen van het filtraat in vacuüm tot een stroop en na extractie van deze stroop met alcohol wordt een oplossing verkregen, waaruit het galacturonzuur na indampen kristalliseert.

Een bereidingswijze, die zeer goede resultaten geeft, is door K. P. LINK en medewerkers (140) uitgewerkt. Als uitgangsmateriaal bezigt hij een, door de *California Fruit Growers Exchange* in de handel gebracht, polygalacturonide. Dit polygalacturonide, „Citruspectin” genaamd, is een product, dat verder gehydrolyseerd is dan het pectinezuur van EHRLICH (§ 2). Wij zouden kunnen zeggen, dat het een pectinezuur is, dat een hoog gehalte aan galacturonzuur en methylalcohol heeft. Deze bereidingswijze, die ook door ons toegepast werd, is in hoofdstuk VI uitvoerig besproken. EHRLICH oefent kritiek uit op deze bereidingswijze (62), doch bij de door hem uitgewerkte methode in dezelfde publicatie bezigt hij als uitgangproduct hetzelfde polygalacturonide.

De fysische en chemische eigenschappen van het galacturonzuur zijn de volgende: Het galacturonzuur kristalliseert in fijne naaldjes, waarvan de samenstelling beantwoordt aan de formule $C_6H_{10}O_7 \cdot H_2O$. Dit zuur noemt EHRLICH α -d-galacturonzuur. Het molecuul water, dat het α -galacturonzuur bevat, moet volgens EHRLICH (54) niet als kristalwater, doch als een constitutief vastgelegd bestanddeel opgevat worden. De kristallen van α -d-galacturonzuur sinteren bij 110—111° C. en smelten bij 160° C. In water opgelost, vertoont het zuur een dalende mutarotatie: $[a]_D^{20} = +98,0^\circ \rightarrow +50,9^\circ = +55,4$ van water *van water*

Nadat het zuur in absolute alcoholische oplossing gekookt is, kristalliseert bij afkoeling der oplossing een zuur van de samenstelling $C_6H_{10}O_7$ uit. Dit, door EHRLICH β -galacturonzuur genoemde, zuur heeft een smeltpunt van 160° C. Het β -galacturonzuur vertoont een stijgende mutarotatie: $[a]_D^{20} = +27,0 \rightarrow +55,3^\circ$.

Het lacton van galacturonzuur is niet bekend, doch is waarschijnlijk wel aanwezig in de, bij de galacturonzuurbereiding verkregen, moederloog.

Behalve de algemeene reacties op de uronzuren zijn er nog eenige speciale reacties op galacturonzuur in de literatuur beschreven:

a. Het galacturonzuur geeft bij oxydatie het onoplosbare slijmzuur, dat men microscopisch aan de kristalvorm en verder aan het smeltpunt kan herkennen. Deze reactie geeft een onderscheid tusschen het galacturonzuur en de beide overige in de natuurproducten bekende uronzuren. De reactie is echter niet specifiek, daar galactose eveneens bij oxydatie slijmzuur geeft.

b. De reactie van EHRlich met basisch loodacetaat is in hoofdstuk XIV beschreven.

c. Als onderscheid tusschen galacturonzuur en glucuronzuur kan de waarneming van H. FITTING (70) in aanmerking komen. Deze vond, dat de protoplasmastroomingen van Vallisneriabladeren, nadat deze stroomingen in het donker tot rust zijn gekomen, door sporen van bepaalde chemische stoffen weer kunnen worden opgeroepen. Tot deze stoffen bleek galacturonzuur te behooren. Glucuronzuur daarentegen gaf het verschijnsel niet te zien.

§ 2. Het voorkomen van galacturonzuur in de pectine-stoffen.

Het galacturonzuur komt zeer verspreid in de plantenwereld voor. Het vormt n.l. de belangrijkste bouwsteen der pectinestoffen. De pectinestoffen zijn celwandstoffen, die wij voornamelijk in de tusschenlamellen aantreffen. Wij vinden de pectinestoffen in de wortels, stengels, bladeren en vruchten der planten. Daarentegen bevatten de verhoude bestanddeelen der planten zeer weinig pectine. De pectinestoffen in de plant hebben niet alle dezelfde samenstelling, daar deze producten door zure of enzymatische inwerking ten deele gehydrolyseerd kunnen zijn.

F. EHRlich (61) onderscheidt vier verschillende vormen, waarin wij de pectinestoffen in de planten aan kunnen treffen:

a. *De pectine van de tusschenlamellen.* Deze pectine is in koud water volledig onoplosbaar. Bij behandeling met kokend water, zuren, alkaliën of ammoniumoxalaat wordt de pectine opgelost.

Bij deze behandeling is de pectine echter gedeeltelijk afgebroken tot de z.g. hydrato- of hydropectine (227).

b. *De in water oplosbare pectinestoffen.* Deze zijn steeds naast de hiervóór genoemde pectinestoffen aanwezig.

Deze pectinestoffen zijn producten, die uit de, onder a bedoelde,

pectinestoffen door gedeeltelijke hydrolyse met zuren of enzymen in de planten gevormd worden.

c. *De, door enzymen of zuren, ver afgebroken pectinestoffen.* Deze pectinestoffen treffen wij voornamelijk in de plantensappen aan. Bij de sinaasappel is b.v. 10%, bij de aalbes 50% en bij de aardbei 60% van de pectinestoffen in het sap opgelost (56). Deze pectinestoffen zijn waarschijnlijk ook door zure of enzymatische hydrolyse uit onoplosbare pectinestoffen ontstaan.

d. *Verouderde pectinestoffen.* Deze pectinestoffen vinden wij in de verhoude bestanddeelen van de plant.

De sub *a* genoemde pectine komt, zooals reeds opgemerkt is, in onoplosbare vorm in de planten voor. Bij extractie van plantenmateriaal met warm water verkrijgen wij de hydrato- of hydropectine. Deze bestaat uit een mengsel, dat voor suikerbietenpectine voor 20—30% uit een linksdraaiend arabaan en voor 70—80% uit calcium-magnesiumzout van pectinezuur is samengesteld (48).

De beide bestanddeelen kunnen bij de bietenpectine door een behandeling met 70%-ige alcohol, waarin het arabaan oplost, gescheiden worden. Het arabaan is een mengsel van verschillende poly-arabinosen. Van deze komt vooral de tetraverbinding in een belangrijk percentage voor.

Dit laatste feit is van belang, daar het pectinezuur, zooals wij dadelijk zullen zien, volgens F. EHRLICH (52, 54), een tetragalacturonzuur bevat. Hij onderstelt dan ook, dat het arabaan in de planten uit het tetragalacturonzuur zou ontstaan. Deze opvatting vinden wij in hoofdstuk XII verder uitgewerkt.

Uit het calcium-magnesiumzout van het pectinezuur kan het zuur zelf door behandeling met zoutzure alcohol verkregen worden. Volgens EHRLICH moet dit pectinezuur als een esterzuur opgevat worden.

De voornaamste bouwsteen van dit zuur is het tetragalacturonzuur met vier carboxylgroepen, waarvan er twee aan methylalcohol veresterd zijn. Op andere plaatsen in het molecuul zijn aan dit tetragalacturonzuur nog 2 acetylgroepen, 1 l-arabinose- en 1 d-galactosegroep gebonden (54). Volgens bovengenoemde onderzoeker zou het pectinezuur uit de bieten dus een dimethyl-diacetyl-arabino-galacto-tetragalacturonzuur zijn.

Andere onderzoekers hebben evenwel voor de samenstelling van

pectinezuur, uit andere materialen verkregen, waarden gevonden, die afwijken van die van EHRLICH (232). Zoo vond o.a. A. C. SLOEP voor de samenstelling van zure pectine van citroenpectine, welke volgens haar als identiek met het pectinezuur van EHRLICH moet worden beschouwd, een uit 4 mol. galacturonzuur en 1 mol. arabinose bestaand veresterd zuur (11% CH_3OH). In de door haar onderzochte pectine werd geen azijnzuur of galactose gevonden (232).

EHRLICH vond waarden bij de pectinezuren, die uit de, in water gemakkelijk oplosbare, pectinestoffen van het vaste vruchtvleesch van verschillende vruchten bereid waren, die afweken van de waarden bij suikerbietenpectine. Hierbij vond hij hogere gehalten aan galacturonzuur en methylalcohol.

Een veel hoger gehalte aan methylalcohol vertoont het pectinezuur, dat uit het sap van verschillende vruchten verkregen kan worden (56). Volgens EHRLICH zouden in dit geval tri- en zelfs tetra-methylesters van tetragalacturonzuur in het pectinezuur aanwezig zijn.

Een verschil tusschen de genoemde pectinezuren is eveneens aan de draaiing merkbaar. Voor de normale pectinestoffen, met een galacturonzuurgehalte van 61% tot 68%, is $[\alpha]_D = +110^\circ$ tot $+175^\circ$, voor de gedeeltelijk afgebroken pectinestoffen, met een galacturonzuurgehalte van 78%, is $[\alpha]_D = +190^\circ$ tot $+200^\circ$ en voor de pectinestoffen uit plantensappen, met een galacturonzuurgehalte van 77% tot 94%, is $[\alpha]_D = +120^\circ$ tot $+240^\circ$.

Bij hydrolyse van het pectinezuur met 5%-ig zoutzuur bij een temperatuur van $80-85^\circ\text{C}$., of beter gedurende 1 uur bij 90°C . (60), slaat na eenige tijd uit de oplossing een, in alcohol en in zoutzuur, moeilijk oplosbaar, zuur neer, dat EHRLICH oorspronkelijk tetragalacturonzuur *a* noemde. Bij deze werkwijze blijft een tweede tetragalacturonzuur in oplossing. Dit, door genoemde onderzoeker tetragalacturonzuur *b* genoemde, zuur kan met alcohol uit de oplossing geprecipiteerd worden.

EHRLICH baseert de onderstelling, dat een tetrazuur aanwezig is, op moleculairgewichtsbepalingen, die hij volgens de kryoscopische methode verricht heeft. Oorspronkelijk dacht hij met di-, in plaats van met tetragalacturonzuur te maken te hebben (50). Bij deze bepalingen had hij echter geen rekening gehouden met de electrolytische dissociatie van de natriumzouten der zuren (54). De natriumzouten bleken in 1/50-n oplossing voor ongeveer 75% in ionen

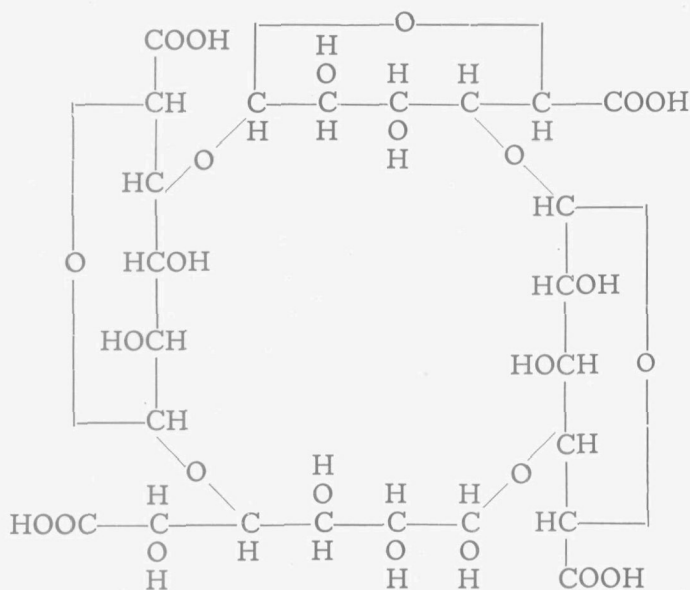
gesplitst te zijn, terwijl de zuren bij dezelfde concentratie voor slechts ongeveer 10% gedissocieerd zijn.

Naast de beide genoemde tetragalacturonzuren onderscheidde EHRlich oorspronkelijk nog een derde zuur, het tetragalacturonzuur *c*, dat uit het tetragalacturonzuur *a* verkregen zou worden door dit laatste zuur in alkali op te lossen. Uit deze oplossing zou met een mineraalzuur het zuur *c* geprecipiteerd worden. Het zuur *c* zou 1 molecuul water meer bevatten dan het zuur *a*.

Recente onderzoekingen hebben EHRlich (59) echter tot de opvatting gebracht, dat er slechts twee tetragalacturonzuren bestaan. Het tetragalacturonzuur *a* zou bij de bereiding, door gedeeltelijke verestering bij het uitkoken met alcohol, gevormd worden uit het tetragalacturonzuur *c*. Alleen de zuren *b* en *c* zouden dus essentiele verschillen vertoonen. Om redenen, die wij dadelijk zullen vermelden, noemt F. EHRlich het tetragalacturonzuur *c* tegenwoordig „pectolzuur” en het tetragalacturonzuur *b* „pectolactonzuur”.

Wat de eigenschappen betreft, reduceert het zuur *c* FEHLING's proefvocht zeer weinig. Het zuur heeft een hoog draaiingsvermogen: $[\alpha]_D = +290^\circ$.

Als formule neemt F. EHRlich een gesloten keten van 4 galacturonzuurmoleculen, onder uittreding van 4 moleculen water, aan:



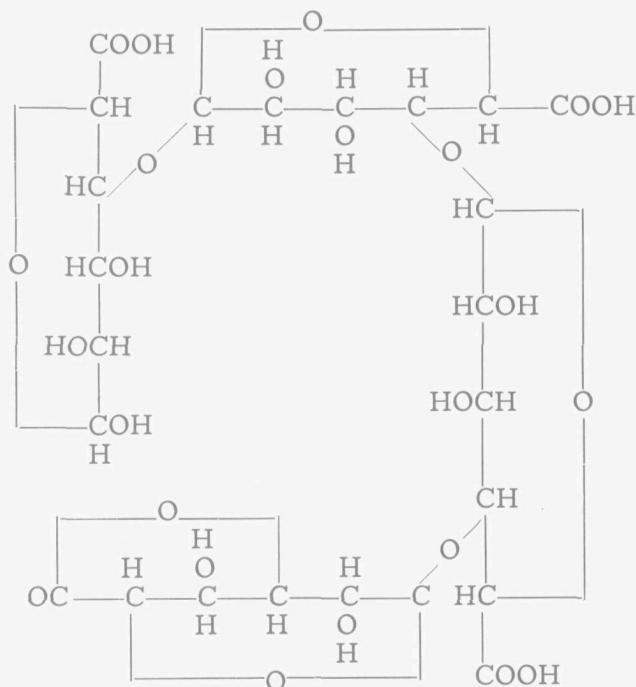
Formule van pectolzuur.

Deze gecompliceerde verbinding heeft verder nog 1 molecuul water opgenomen, dat als een constitutief bestanddeel beschouwd moet worden. Het genoemde molecuul water verdwijnt namelijk niet bij 100°C . Het pectolzuur zou dus mono-hydrato-anhydro-tetragalacturonzuur zijn. F. EHRLICH noemt het zuur pectolzuur, aangezien bij de zoutzure hydrolyse van het pectinezuur, door afsplitsing van de, aan het tetragalacturonzuur bevestigde arabinose-, galactose-, acetyl- en methoxylgroepen, alle alcoholische hydroxylgroepen van het tetrazuur vrijkomen.

Het pectolactonzuur zou van het pectolzuur verschillen door zijn vermogen om FEHLING's proefvocht te reduceeren. Het pectolactonzuur heeft een kleiner draaiingsvermogen: $[\alpha]_{\text{D}} = +250^{\circ}$.

Blijkens de uitkomsten bij de titratie komen drie der vier zuurgroepen als vrije carboxylgroepen voor. De vierde zuurgroep komt in lactonvorm voor.

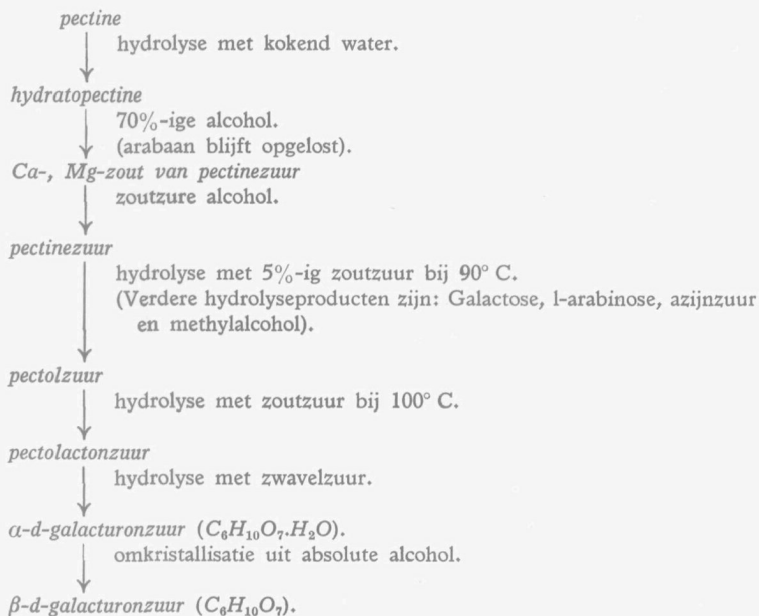
F. EHRLICH neemt als formule voor het pectolactonzuur een open keten van vier galacturonzuurmoleculen, onder uittreding van 3 moleculen water, aan:



Formule van pectolactonzuur.

Wij kunnen de resultaten van EHRlich's onderzoekingen en opvattingen in het volgende schema samenvatten:

TABEL I.



Aan deze beschouwingen moet echter direct worden toegevoegd, dat EHRlich's onderstellingen betreffende de tetragalacturonzuren felle kritiek ondervinden. K. H. MEIJER en H. MARK (158) hebben er in 1930 op gewezen, dat de moleculairgewichtsbepalingen, die F. EHRlich tot de aanwezigheid van tetragalacturonzuren deden besluiten, onjuist zijn. De bedoelde zuren behooren tot de lyophile kolloïden en deze geven bij kryoscopische bepaling te kleine moleculairgewichten. De genoemde onderzoekers hebben de overtuiging, dat de bovengenoemde zuren uit lange ketens opgebouwd zijn. Deze meening baseeren zij op de volgende eigenschappen der zuren. De pectine geeft, evenals het pectolzuur van F. EHRlich, gemakkelijk gels, de pectinedraden vertoonen dubbele breking en uit geconcentreerde oplossingen van pectine kunnen zij gemakkelijk draden trekken.

MEIJER en MARK nemen soortelijke ketens van galacturonzuur-eenheden aan als bij cellulose ketens van glucose-eenheden worden

aangenomen. Een analoge opvatting huldigen deze beide onderzoekers ook voor het arabaan.

Tegenover de hier boven bedoelde pectinestoffen zou de pectine van verhoude bestanddeelen groote afwijkingen vertoonen. Een karakteristiek voorbeeld daarvan zou de vlaspectine zijn (51). Volgens EHRLICH hebben wij in de pectine van de verhoude bestanddeelen een overgang van de oorspronkelijke pectine naar lignine te zien. Hij vermoedt, dat de pectine door een enzymatisch plaatsgrijpende anhydriseering en reductie in lignine overgaat.

De hydratopectine, die zij uit vlas kunnen bereiden, is een mengsel van een hexopentosaan, van een lignineachtige stof en van een calcium-magnesiumzout van pectinezuur. Het hexopentosaan is opgebouwd uit l-arabinose, l-xylose, d-galactose en d-fructose. In het alcoholische extract van het hexopentosaan blijft een, in alkaliën oplosbare, stof van de samenstelling van lignine achter.

Behalve een hydrolytische splitsing der pectine met zuren, is eveneens een enzymatische splitsing mogelijk. Wat deze splitsing betreft, zullen wij volstaan met op te merken, dat EHRLICH naast de bekende enzymen (53), nog eenige andere enzymen (59, 60) meent te moeten onderscheiden, waarvan voor dit overzicht vooral de pectolase interessant is, aangezien dit enzym, dat vooral in de takadiastase voorkomt, het pectolzuur hydrolyseert tot het galacturonzuur. Deze hydrolyse verloopt, evenals de zure hydrolyse, over het pectolactonzuur, dat EHRLICH dan ook als tusschenproduct heeft kunnen afscheiden.

§ 3. Het voorkomen van, niet in pectine gebonden, galacturonzuur in de planten.

Behalve het veelvuldig voorkomen van galacturonzuur in de pectinestoffen der planten, zijn in de literatuur nog enkele gevallen beschreven van de aanwezigheid van galacturonzuur in hemicelulosen (poly-uroniden) en in glucosieden.

Wij zullen de planten, waarin het galacturonzuur in de genoemde vormen voorkomt, hieronder opsommen, waarbij wij tevens de, naast het uronzuur voorkomende, suikers zullen opgeven.

Familie: *Pinaceae*.

Picea excelsa LINK (Fijne Spar) — E. HÄGGLUND en medewerkers (86) hebben bij de hydrolyse van een, uit vurenhout geïsoleerde, hemicellulose galacturonzuur, galactose, glucose, mannose, fructose en een pentose gevonden.

Familie: *Liliaceae*.

Smilax medica SCHLECHT. ET CHAM. — H. KAUFMANN, C. FUCHS (16) en A. W. v. D. HAAR (85) konden uit de sarsaparillawortel een saponine isoleeren, dat bij hydrolyse o.a. galacturonzuur en glucose gaf. Galactose kon niet aangetoond worden.

Allium Macleanii BAKER — C. GRIEBEL en G. STEINHOFF (76) hebben uit een, uit Indië ingevoerde, bol van *Allium Macleanii* een saponine geïsoleerd, dat bij hydrolyse o.m. galacturonzuur, galactose, arabinose en een methylpentose gaf.

Familie: *Fagaceae*.

Fagus silvatica L. (Beuk) — Zooals reeds is opgemerkt, heeft M. H. O'DWYER (188) 2 hemicellulosen uit beukenhout geïsoleerd. De hemicellulose B gaf bij hydrolyse galacturonzuur en arabinose.

Familie: *Leguminosae*.

Astragalus Tragacantha L. — In de gom, die deze struik afscheidt, komt naast fucose en arabinose ongeveer 30% galacturonzuur voor (265). Er zijn twee soorten tragacanthgom. In de eene soort komt xylose, in de andere arabinose voor. Doch in beide gevallen kan galacturonzuur aangetoond worden. F. WEINMANN heeft het galacturonzuur kristallijn uit deze gom bereid.

Familie: *Tiliaceae*.

Corchorus capsularis L. (Jute) — J. K. CHOWDHURY en T. M. SAKA (35) hebben uit de jutevezel een hemicellulose geïsoleerd, die was samengesteld uit galacturonzuur, glucose, galactose, xylose en arabinose.

Familie: *Cactaceae*.

Opuntia fulgida ENGELM. — L. SANDS en R. KLAAS (212) hebben de gom van deze plant onderzocht. Onder de hydrolyseproducten van de gom vonden zij galacturonzuur, arabinose en rhamnose.

Familie: *Araliaceae*.

Aralia montana BLUME — In de bladeren en in de stengels komt een saponine voor, dat door A. W. v. D. HAAR nader onderzocht is. Bij hydrolyse van het saponine werd onder de hydrolyseproducten o.m. galacturonzuur, l-arabinose, galactose, glucose en een methylpentose gevonden.

HOOFDSTUK III.

Vroegere onderzoekingen over polymannuronzuren en fucoïdinezuur.

§ 1. Vroegere onderzoekingen over het alginezuur (polymannuronzuur A).

E. C. C. STANDFORD (236) extraheerde met een verdunde soda-oplossing uit verschillende Fucoïdeeen een slijmachtige stof, die hij „algine” noemde. Uit de algineoplossing kon hij met zuren een zuur precipiteeren. Aan dit zuur gaf O. SCHMIEDEBERG (218) de naam „laminarinezuur”. A. KREFTING (123, 124) bewees, dat het zuur geen stikstof in het molecuul bevatte.

H. KYLIN (129, 130) heeft in een uitvoerige studie, die hij over de biochemie der zee-algen verricht heeft, ook over het voorkomen van het laminarinezuur in *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata* en *Fucus vesiculosus* mededeelingen gedaan. Hij noemde het zuur „alginezuur”. Hij bewees, dat bij extractie van zee-algen met een verdunde soda-oplossing, behalve het alginezuur, nog een tweede zuur, n.l. fucinezuur, uit de wieren in oplossing ging. Daarom paste hij een andere bereidingswijze toe, waarbij hij het alginezuur in vrij zuivere toestand verkreeg. Daartoe extraheerde hij gedroogde zeewieren gedurende 1 uur met kokend water, waarbij het alginezuur als natriumzout in oplossing ging. Van het tweede zuur ging onder deze omstandigheden zeer weinig in oplossing. Uit de extractievloeistof precipiteerde KYLIN het alginezuur met verdund zwavelzuur. Het zuur werd gezuiverd door het in loog op te lossen en het opnieuw met zwavelzuur te precipiteeren.

Het alginezuur is een witte, in water onoplosbare, stof. Het draaiingsvermogen van het natriumzout in water bedraagt 136°. Het zuur geeft de phloroglucine-zoutzuur- en de orcine-zoutzuur-reactie. Bij koken met verdunde mineraalzuren wordt het langzaam gehydrolyseerd. De daarbij gevormde hydrolyseproducten heeft KYLIN echter niet onderzocht.

Vele latere onderzoekers hebben een andere bereidingswijze toe-

gepast, n.l. een behandeling van het algenmateriaal met loog. Hierbij gaat echter ook het, in § 2 vermelde, fucinezuur in oplossing, zoodat zij mengsels verkregen. Voor hun onderzoekingen was dit echter geen bezwaar, daar het fucinezuur veel overeenkomst in eigenschappen met het alginezuur vertoont. Ook bij hydrolyse geven de beide zuren hetzelfde hydrolyseproduct.

Uit *Macrocystis pyrifera* hebben D. R. HOAGLAND en L. L. LIEB (105) een aschvrij alginezuur geïsoleerd met brutoformule $C_{21}H_{27}O_{20}$. Op grond van equivalentgewichtsbepalingen en van de analyse der metaalzouten kwamen zij tot de overtuiging, dat het alginezuur een tweebasisch zuur zou zijn. Bij hydrolyse van het alginezuur met 2%-ig zoutzuur kregen zij een sterk reduceerende oplossing. Uit deze, FEHLING's proefvocht reduceerende, oplossing konden met phenylhydrazine twee osazonen afgescheiden worden, n.l. een geel en een rood osazon. Het smeltpunt van het gele osazon bedroeg $154^{\circ}C$. en het draaiingsvermogen bedroeg $-0^{\circ}10'$.

Volgens D. R. HOAGLAND en L. L. LIEB zou de gele verbinding waarschijnlijk xylosazon zijn.

ATSUKI en TOMODA (12) isoleerden uit laminariasoorten een alginezuur met een equivalentgewicht van 221. Zij meenden, dat alginezuur een pectineachtige stof was, waarvan de belangrijkste bouwsteen galacturonzuur zou zijn.

Voor het alginezuur, dat E. SCHMIDT en F. VOCKE (222) uit *Fucus serratus* verkregen hadden, vonden zij een equivalentgewicht van 185. Bij hydrolyse van het alginezuur met zwavelzuur verkregen deze onderzoekers een zuur, dat als cinchoninezout met een smeltpunt van $204^{\circ}C$. afgescheiden kon worden. Uit het feit, dat dit smeltpunt overeenstemt met dat van het cinchoninezout van glucuronzuur, concludeerden zij, dat het alginezuur een polyglucuronzuur zou zijn. Het polyglucuronzuur zou in het alginezuur in twee verschillende modificaties aanwezig zijn, n.l. in een gemakkelijk te hydrolyseeren vorm, het polyglucuronzuur B, en in een moeilijk te hydrolyseeren vorm, het polyglucuronzuur A.

COLIN (38) heeft het alginezuur uit *Laminaria flexicaulis* geïsoleerd. Op grond van zijn analyses van het bariumzout van het zure hydrolyseproduct van alginezuur vermoedde hij, dat de componenten van het alginezuur glucuronzuur en galacturonzuur waren.

W. L. NELSON en L. H. CRETCHER (168, 169) zijn de eersten, die de werkelijke bouwsteen van het alginezuur gevonden hebben. Zij

werkten met *Macrocystis pyrifera*. Het daaruit geïsoleerde zuur had, blijkens de hoeveelheid alkali, die voor neutralisatie noodig was, een equivalentgewicht van 176—184.

Het zuivere alginezuur reduceerde FEHLING's proefvocht niet. Bij koken met 12%-ig zoutzuur werd 24—25% koolzuur van het alginezuur afgesplitst. Het alginezuur werd met zwavelzuur gehydrolyseerd. Als hydrolyseproduct isoleerden de genoemde onderzoekers een carbonyl-oxy-zuur. Het smeltpunt van het cinchoninezout van dit zuur bedroeg 152° C. Het carbonyl-oxy-zuur werd met broom geoxydeerd. Het gevormde oxydatieproduct gaf met ammoniak een gekristalliseerd diamide met een smeltpunt van 189° C. Het verkregen diamide bleek identiek te zijn met het diamide van mannosuikerzuur. NELSON en CRETCHER concludeerden uit deze resultaten, dat de bouwsteen van het alginezuur mannuronzuur is.

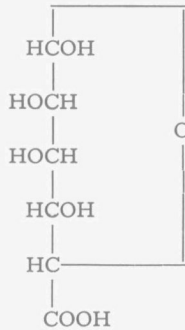
Ongeveer te zelfder tijd hebben G. M. BIRD en P. HAAS (22) analoge proefnemingen verricht en kwamen tot hetzelfde resultaat.

NELSON en CRETCHER nemen aan, dat het alginezuur een polymannuronzuur is, waarbij de carboxylgroepen vrij zijn en de aldehydegroepen tengevolge van de vorming van glucosiedbindingen beschermd zijn.

In 1930 (170) is het aan de genoemde onderzoekers gelukt het hydrolyseproduct van het alginezuur als lacton kristallijn te verkrijgen (smpt.: 140° C.). Zij (171) hebben hetzelfde kristallijne lacton uit verschillend algenmateriaal, zooals *Macrocystis pyrifera*, *Fucus serratus* en *Laminaria saccharina* bereid. Deze waarnemingen zijn door E. SCHOEFFEL en K. P. LINK (223) bevestigd. Het gelukte deze onderzoekers (143, 224) bovendien het vrije mannuronzuur in een α - en een β -vorm kristallijn te verkrijgen. Het mannuronzuur vertoont, evenals het glucuronzuur en het galacturonzuur, in waterige oplossing mutarotatie.

Ten slotte hebben C. NIEMANN en K. P. LINK in 1933 het zuur synthetisch verkregen door partieele reductie van het dilacton van mannosuikerzuur.

Deze resultaten hebben tot de opstelling van de hierbij weergegeven structuurformule geleid.



Formule van d-mannuronzuur.

§ 2. Vroegere onderzoeken over het fucinezuur (polymannuronzuur B).

Zoals N. WILLE (266) reeds in 1897 aantoonde, bestaat het weefsel der Laminariaceën uit dikwandige cellen met celluloseachtige wanden en middenlamellen, die door jodium en 1%-ig zwavelzuur blauw gekleurd worden. Deze onderzoeker nam aan, dat deze stof uit calciumpectinaat zou bestaan.

C. v. WISSELINGH (269) heeft deze stof nader onderzocht en „fucine” genoemd.

H. KYLIN (130) heeft een aantal Fucoïdeën op de aanwezigheid van fucine onderzocht. Het bleek hem, dat het fucine bij de grovere soorten wel en bij de fijnere soorten niet voorkomt. Voor de bereiding uit algenmateriaal heeft H. KYLIN een methode uitgewerkt. Na extractie van het algine uit het algenmateriaal met kokend water, behandelt hij het residu met soda. Uit het alkalische extract wordt met een mineraalzuur het fucinezuur geprecipiteerd.

Het algine en fucine zijn twee zeer op elkaar gelijkende stoffen. Een karakteristiek verschil is het gedrag t. o. v. jodium met verdund zwavelzuur (zie hoofdstuk VII). De draaiing van het natriumfucinaat ($[\alpha]_D = -120^\circ$) is iets kleiner dan van het natriumalginaat. Bij hydrolyse geeft het fucinezuur, evenals het alginezuur, mannuronzuur.

Deze zuren vervullen blijkbaar de rol, die de pectine bij de hoogere planten vervult.

§ 3. Vroegere onderzoekingen over het fucoïdinezuur.

Fucoïdine is een, in de algen voorkomend, membraanslijm, dat in 1913 door H. KYLIN (129) in de door hem onderzochte Fucoïdeeen. Bijzonder rijk aan fucoïdine zijn de Laminariasoorten en *Fucus serratus*. Het fucoïdine is het calciumzout van fucoïdinezuur. Het zuur wordt verkregen door extractie der algen met water. Uit de extractievloeistof wordt het, eveneens opgeloste, alginezuur met bariamacetaat geprecipiteerd. Uit het filtraat wordt vervolgens het bariumzout van fucoïdinezuur met alcohol neergeslagen.

Het zuur geeft volgens H. KYLIN de phloroglucine-zoutzuur-reactie en de reactie van ROSENTHALER op methylpentosen. Bij de hydrolyse van het zuur kon in de reactievloeistof fucose (105, 130) worden aangetoond. De aanwezigheid van fucose in de bedoelde wieren was reeds veel eerder bekend (77, 166), doch niet als bestanddeel van het fucoïdinezuur.

De verdere samenstelling van het zuur is nog onbekend.

HOOFDSTUK IV.

Vroegere onderzoeken over het ascorbinezuur (vitamine C).

§ 1. Ontdekking en isoleering van ascorbinezuur.

De ontdekking van het ascorbinezuur door A. SZENT-GYÖRGYI was het resultaat van uitvoerige studies over de oxydatie-reductie-systemen in planten en dieren.

De genoemde Hongaarsche onderzoeker onderstelde, dat de bijnieren van dieren op de een of andere wijze in die oxydatie-reductie-processen betrokken zouden zijn. Bij behandeling der bijnieren met een zilvernitraatoplossing werd de oppervlakte der bijnieren geheel zwart gekleurd door gereduceerd zilver.

SZENT-GYÖRGYI (242) heeft in 1927 uit de bijnieren van koeien deze reduceerende stof geïsoleerd. Daartoe extraheerde hij de bijnieren met methylalcohol en isoleerde de reduceerende stof, oorspronkelijk door hem C_{XII} genoemd, als loodzout. Deze stof C_{XII} werd later door hem kristallijn verkregen.

SZENT-GYÖRGYI onderstelde, dat er geen wezenlijk verschil zou zijn in het mechanisme van het oxydatie-reductie-proces bij dieren en bij planten. Hij had bij zijn proefnemingen reeds verschillende aanwijzingen verkregen, dat in de planten eveneens een sterk reduceerende stof aanwezig zou zijn. Zoo wordt b.v. het perssap van koolbladeren eerst na eenige tijd bruin. Deze bruinkleuring is te wijten aan de oxydatie van phenolachtige producten. Dat de bruinkleuring eerst na eenige tijd optreedt, is een aanwijzing, dat eerst een andere stof wordt geoxydeerd, die een grooter reduceerend vermogen bezit dan de phenolachtige producten. Het gelukte hem in 1928 (243) dan ook uit sinaasappelsap en uit het perssap van koolbladeren dezelfde stof C_{XII} in kristallijne toestand te bereiden.

Aangezien hij vermoedde, dat het zuur C_{XII} een isomeer van glucuronzuur zou zijn, noemde hij het „hexuronzuur”. De opbrengst aan hexuronzuur uit het genoemde plantenmateriaal is klein, n.l. 100 mg gekristalliseerd zuur uit 1 l sinaasappelsap en 250 mg zuur uit 5 l perssap van koolbladeren.

Daar de stof vanwege haar typische eigenschappen dadelijk de aandacht van vele onderzoekers trok, werd door A. SZENT-GYÖRGYI getracht de bereiding van het hexuronzuur op een grotere schaal uit te voeren. Het genoemde plantenmateriaal bleek daarvoor niet geschikt te zijn. Bij verwerking van kleine hoeveelheden sap (3 l) kon hij het hexuronzuur kristallijn verkrijgen. Bij verwerking van grotere hoeveelheden kon hij het zuur niet isoleren. Waarschijnlijk was in dit laatste geval het hexuronzuur, door de langere bereidingsduur, door de luchtzuurstof geoxydeerd.

Een goede bereidingswijze was die uit de bijnieren van koeien. SZENT-GYÖRGYI heeft in Amerika deze bereiding in het groot uitgevoerd, waarbij hij de bijnieren van een der grootste abattoirs betrok. Zoo bereidde hij in dat jaar ongeveer 5 g hexuronzuur.

In de herfst van 1932 bleek hem (247), dat de, in Hongarije voorkomende, paprika's (vruchten van *Capsicum annuum*) relatief veel hexuronzuur bevatten en het zuur gemakkelijk uit deze vruchten verkregen kon worden (zie hoofdstuk X).

In eenige maanden isoleerde hij uit de paprika's ongeveer 500 g gekristalliseerd hexuronzuur, dat hij op ruime schaal aan andere onderzoekers voor hun onderzoekingen afstond.

Na de talrijke onderzoekingen, die over het zuur verricht zijn, is men tot de overtuiging gekomen, dat het zuur geen uronzuur is.

SZENT-GYÖRGYI en W. N. HAWORTH hebben voorgesteld om het hexuronzuur voortaan „ascorbinezuur” te noemen.

Het eigenaardig gedrag van het zuur wordt wel het beste weergegeven door de uitlating van W. N. HAWORTH: „This substance has unique chemical as well as physiological properties”.

§ 2. Eigenschappen, structuur en synthese van ascorbinezuur.

SZENT-GYÖRGYI (243) vond uit de elementairanalyses en uit de moleculairgewichtsbepalingen als formule voor het ascorbinezuur $C_6H_8O_6$. Het zuur geeft goed gevormde kristallen met een smeltpunt van $192^\circ C$. (102). Het ascorbinezuur vertoont verder geen mutarotatie, in tegenstelling met vroegere beweringen: $[\alpha]_D = +24^\circ$ (243). In 2-n loog stijgt de rotatie tot 160° . Deze stijging is niet aan ontleding van het zuur te wijten, want bij aanzuren daalt de rotatie weer tot de oorspronkelijke grootte (98).

Het zuur reduceert FEHLING's proefvocht, een kaliumperman-ganaat- en een neutrale zilvernitraatoplossing reeds bij kamer-temperatuur. Een merkwaardige eigenschap van het ascorbinezuur is (41), dat het zuur per molecuul 2 jodiumatomen kan verbruiken onder vorming van 2 moleculen joodwaterstof. Het daarbij gevormde oxydatieproduct, het dehydro-ascorbinezuur, kan met zwavelwaterstof weer tot ascorbinezuur gereduceerd worden. Dit eerste oxydatie-product wordt eveneens onder de invloed van cupri-ionen gevormd. Deze eigenschap werd het eerst door A. SZENT-GYÖRGYI in 1928 op-gemerkt. Door luchtzuurstof wordt het, in water opgeloste, ascorbinezuur gemakkelijk geoxydeerd. Deze oxydatie wordt versneld door alkali en door temperatuursverhooging. Onder afsluiting van luchtzuurstof is het in water opgeloste ascorbinezuur een bestendig zuur en kan dan met verdunde zuren of alkaliën gekookt worden, zonder dat koolzuur afgesplitst wordt (115).

Bij koken der alduronzuren met verdunde zuren worden aan-merkelijke hoeveelheden koolzuur afgesplitst, waaruit blijkt, dat het ascorbinezuur geen uronzuur is (zie hoofdstuk XIII).

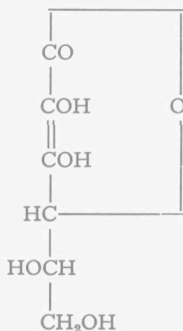
Het ascorbinezuur geeft bij koken met 12%-ig zoutzuur furfural en koolzuur (41). De α -naphthol- en de orcine-reactie vallen positief, de naphtoresorcine-reactie valt daarentegen negatief uit. Van het zuur zijn verder een phenylhydrazon (smpt.: 187° C.) (98) en een p-broomphenylosazon (smpt.: 230—235° C.) (102) bekend.

De eerst opgestelde formules zijn die van A. SZENT-GYÖRGYI (243), van P. KARRER (113) en van F. MICHEEL en K. KRAFT (159, 160, 162). Van deze formules gaf die van MICHEEL en KRAFT de bijzondere eigenschappen het beste weer. Deze onderzoekers hebben de aan-vezigheid van een furanring aangenomen.

Deze formule is echter door E. G. COX, E. L. HIRST (42) en W. N. HAWORTH (94) bestreden. De eersten doen dit op grond van de vorm van de ascorbinezuurkristallen.

De tegenwoordig vrijwel algemeen aangenomen formule werd door E. L. HIRST (103) voorgesteld. Talrijke andere Engelsche onderzoekers (94, 98, 104) o. a. W. N. HAWORTH hebben bewijs-materiaal voor deze formule verzameld. F. MICHEEL en K. KRAFT (161) nemen tegenwoordig ook de formule van HIRST aan. ¹⁾

¹⁾ Niettegenstaande deze bevestigingen, bestaat mijns inziens nog twijfel aan de juistheid van de constitutieformule van HIRST.



Formule van ascorbinezuur volgens HIRST.

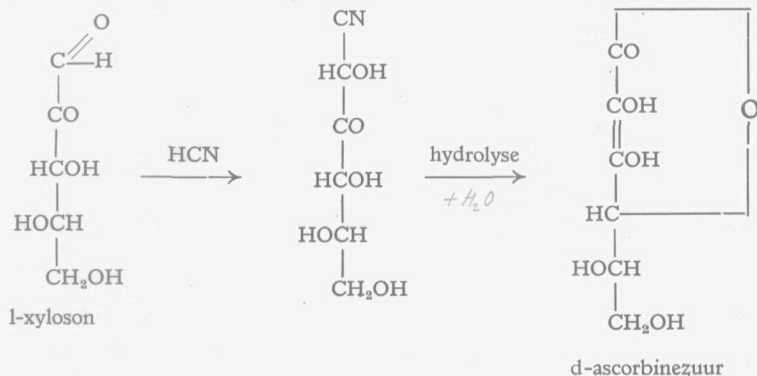
HIRST is tot deze formule gekomen door soortgelijke oxydatieproeven als die van F. MICHEEL en K. KRAFT.

Vele van de bekende eigenschappen van het zuur kunnen uit deze structuurformule verklaard worden. De zure eigenschappen van het ascorbinezuur zijn niet afkomstig van zuur, dat door de instelling van een lacton-zuur-evenwicht vrijkomt, doch van een der

enolgroepen $\left(\begin{array}{c} | \\ \text{COH} \\ || \end{array} \right)$. De lactonring kan opgeheven worden door loog, nadat eerst de enolische hydroxylgroepen gemethyleerd zijn.

Na het opstellen der structuurformule heeft men getracht het ascorbinezuur synthetisch te bereiden. De eersten, die hierin slaagden, waren T. REICHSTEIN en medewerkers (204, 205). Als uitgangspunt bezigden zij xyloson. Door additie van cyaanwaterstof en daarop volgende hydrolyse, konden zij een kristallijn product afscheiden, dat in fysische en chemische eigenschappen geheel op het ascorbinezuur geleek. Toentertijd namen zij de formule van F. MICHEEL en K. KRAFT aan en zodoende hebben zij hun resultaten verkeerd geïnterpreteerd. Nadat W. N. HAWORTH en medewerkers hen daarop gewezen hadden, hebben zij (206) voor hun product de formule van HIRST aangenomen.

Het reactieschema van hun synthese is als volgt:

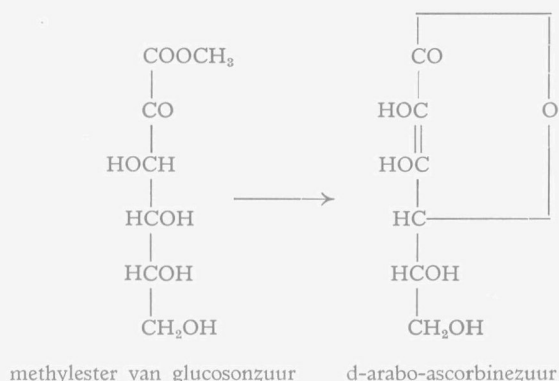


Engelsche onderzoekers (13, 94), hebben deze synthese op analoge wijze uitgevoerd. Zij hebben ook isomeren en homologen van het ascorbinezuur bereid door van andere pentosen of hexosen uit te gaan.

De producten worden genoemd naar de suiker, waaruit zij bereid zijn (14). Het product, dat op deze wijze uit 1-arabinose bereid kan worden, wordt 1-arabo-ascorbinezuur en het product, dat uit d-galactose bereid kan worden, wordt d-galacto-ascorbinezuur genoemd.

Het in de natuur voorkomende ascorbinezuur zou dus 1-xylo-ascorbinezuur genoemd moeten worden.

K. MAURER en B. SCHIEDT (153), evenals H. OHLE (191), hebben een andere synthetische bereidingswijze voor het ascorbinezuur toegepast. K. MAURER en B. SCHIEDT hebben de methylester van glucosonzuur (2-ketogluconzuur) in pyridine- of methylalcoholische-oplossing met natriummethylaet behandeld. Zij verkregen daarbij een amorf precipitaat, waaruit een zuur van de samenstelling $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ geïsoleerd kon worden. Zij hebben hierbij het d-arabo-ascorbinezuur verkregen. Deze synthese kan door het volgende schema weergegeven worden:



J. TILLMANNNS en medewerkers (252) hebben een titratiemethode uitgewerkt om het ascorbinezuur kwantitatief te bepalen.

Het ascorbinezuur reduceert n.l. de kleurstof 2-6-dichloorphenol-indophenol tot de kleurloze leukobase. Deze kleurstof wordt echter ook door een groot aantal andere stoffen, o.a. phenolen, gereduceerd.

L. J. HARRIS en S. N. RAY (90) verkregen bij titratie van sinaasappelsap, dat lang aan de lucht heeft gestaan, met genoemde kleurstof dezelfde uitkomsten als bij de titratie van versch sinaasappelsap; dit wijst er op, dat de methode met voorzichtigheid moet worden toegepast. Zij hebben de methode een weinig gewijzigd, n.l. door de titratie in een sterker zuur milieu (pH = 2,5) uit te voeren.

TH. W. BIRCH heeft een micromethode voor de bepaling van het ascorbinezuur, volgens hetzelfde principe als dat van TILLMANNNS, uitgewerkt (20).

§ 3. Ascorbinezuur is identiek met vitamine C.

J. TILLMANNNS had de titratie met de kleurstof 2-6-dichloorphenolindophenol oorspronkelijk op plantensappen toegepast en hij had opgemerkt, dat het reductievermogen van plantensappen evenredig was met de vitamine-C-activiteit.

Toen hem de eigenschappen van het ascorbinezuur door het onderzoek van A. SZENT-GYÖRGYI bekend werden, onderstelde hij dan ook in 1930 (253), dat dit zuur identiek zou zijn met vitamine C.

SZENT-GYÖRGYI en J. L. SVIRBELY (244, 245, 246) hebben deze onderstelling nagegaan en het bleek hun, dat het door hen bereide

ascorbinezuur inderdaad vitamine-C-activiteit bezat. Dit feit werd door talrijke andere onderzoekers bevestigd.

De bijnieren van cavia's kleurden zich met zilvernitraat na eenige tijd zwart, hetgeen aan het ascorbinezuur toegeschreven moest worden. Bij uitvoering van deze proeven met nieren van dieren, die scheurbuik hadden, werd het zilvernitraat niet gereduceerd.

Het is echter denkbaar, dat de vitamine-C-activiteit niet aan het ascorbinezuur zelf, doch aan begeleidende onzuiverheden te wijten was. SZENT-GYÖRGYI vond evenwel, dat na herhaalde omkristallisatie van ascorbinezuur nog dezelfde minimum-dosis voldoende was om scheurbuik te voorkomen. Hij heeft ook het gekristalliseerde acetonderivaat uit ascorbinezuur bereid en vervolgens het acetonderivaat ontleed. Het ascorbinezuur, dat hij daarbij verkreeg, had nog dezelfde vitamine-C-activiteit.

Verder blijkt ascorbinezuur, dat uit verschillende grondstoffen bereid is, dezelfde activiteit te bezitten.

Het ascorbinezuurgehalte der planten blijkt recht evenredig te zijn met de vitamine-C-activiteit. Uitvoerige proefnemingen op dit gebied hebben T. W. BIRCH, L. J. HARRIS, S. N. RAY en W. J. DANN verricht (21).

Zonder eenige twijfel kan dan ook als bewezen beschouwd worden, dat ascorbinezuur identiek is met vitamine C.

AANHANGSEL.

Auxinen.

Volledigheidshalve moet op deze plaats nog melding worden gemaakt van een stof, de z.g. *groeistof*, welke in de laatste jaren in sterke mate de aandacht heeft getrokken en nauw verwant met de hiervóór genoemde carbonyl-oxy-zuren schijnt te zijn.

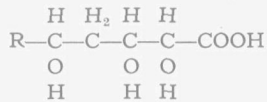
Deze groeistof, ook wel *auxine* genaamd, zou de celstrekking bij de groei van een plant bevorderen. Het oorspronkelijke uitgangproduct voor de bereiding vormden de mais- en havercoleoptielen, terwijl later deze groeistof ook aanwezig bleek te zijn in de urine van menschen en dieren.

F. A. F. C. WENT en medewerkers (265a) hebben de beteekenis van die groeistof voor de groei bestudeerd en ook de eigenschappen van de stof vastgesteld, terwijl F. KÖGL en medewerkers

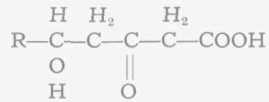
(121a, 121b) onderzoeken over de chemische samenstelling van auxine verricht hebben.

Auxine bleek te bestaan uit twee nauw verwante stoffen, die auxine-*a* en auxine-*b* genoemd zijn. Auxine-*a* is een oxy-zuur van de samenstelling $C_{18}H_{32}O_5$, auxine-*b* is een keto-oxy-zuur van de samenstelling $C_{18}H_{30}O_4$.

Wij geven hieronder de tegenwoordig veelal aangenomen constitutieformules weer.



Auxine-a



Auxine-b

De groep R stelt in beide gevallen voor: een koolstofring met een dubbele binding, waaraan een alifatische rest gebonden is.

EIGEN ONDERZOEK.

HOOFDSTUK V.

Bereiding van cordofanzuur, aldobionzuur en glucuronzuur.

§ 1. **Bereiding van cordofanzuur, aldobionzuur en glucuronzuur uit arabische gom volgens de eerste methode van F. Weinmann.**

Het glucuronzuur werd door ons allereerst uit arabische gom bereid.

Arabische gom is het (Ca, Mg, K)-zout van een complex zuur. O. SULLIVAN (240, 241) verkreeg bij de gedeeltelijke hydrolyse van arabische gom met verdund zwavelzuur een zuur met de formule $C_{23}H_{38}O_{22}$, dat hij λ -arabinezuur noemde. Daarentegen vonden L. H. CRETCHER en C. L. BUTLER (26, 27, 28) $C_{12}H_{20}O_{12}$ als formule, terwijl zij als eersten aantoonde, dat uit dit zuur bij hydrolyse glucuronzuur ontstaat. Volgens laatstgenoemde onderzoekers moet dit zuur als een aldobionzuur worden opgevat, samengesteld uit één molecuul glucuronzuur en één molecuul galactose. Het is M. HEIDELBERGER en F. E. KENDALL (97) gelukt dit aldobionzuur in gekristalliseerde toestand te verkrijgen. Andere onderzoekers hebben dit echter niet kunnen herhalen. De structuur van het aldobionzuur is door S. W. CHALLINOR, W. N. HAWORTH en E. L. HIRST (31) onderzocht. Zij beschouwen het zuur als glucuronisido-6-galactose.

De eerste, die het glucuronzuur uit arabische gom in kristallijne toestand heeft verkregen, is F. WEINMANN (264, 265). Hij gaf hiervoor een voorschrift, dat hij later heeft gewijzigd.

Het glucuronzuur werd door ons in de eerste plaats bereid volgens de eerste methode van WEINMANN. Daartoe werd de arabische gom (merk Cordofan), na gedeeltelijke hydrolyse tot het zoogenaamde cordofanzuur, volledig met 5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerd.

Uit de arabische gom werd door verhitting gedurende 1½ uur met 2%-ig zoutzuur het cordofanzuur verkregen.

300 g arabische gom (merk Cordofan) werden in een mortier tot een wit poeder fijn gewreven en vervolgens in 450 cm³ 2%-ig zoutzuur opgelost. Deze oplossing werd in een rondkolf met terugvloeiakoeler op het stoombad op 98° C. verhit.

De polarisatie in een buis van 1 dm bedroeg na 1 uur: 18.8°, na 1½ uur: 18.8° en na 1¾ uur: 18.7°.

De oorspronkelijk visceuze oplossing was nu dunvloeibaar en werd van slijmstoffen en onreinheden afgefiltreerd. Het lichtgeelbruin gekleurde filtraat werd onder goed roeren in 3 l 96%-ige alcohol uitgegoten, waarbij het cordofanzuur zich als een wit slijmachtig precipitaat afzette. Na afgieten der bovenstaande oplossing werd het neerslag gezuiverd door het op te lossen in 250 cm³ water en nogmaals met 3 l 96%-ige alcohol te precipiteeren. Het neerslag werd afgefiltreerd en in vacuüm boven calciumoxyde en zwavelzuur gedroogd. Opbrengst: 150 g.

Dit cordofanzuur was na drogen en fijnwrijven een volkomen wit poeder.

Oorspronkelijk dacht WEINMANN, dat hij langs deze weg aldobionzuur verkreeg. In zijn laatste publicatie komt hij echter hierop terug en noemt hij het zuur naar de naam der gom, waaruit het zuur bereid is.

De arabische gom moet bij deze proef goed fijn gewreven worden, daar ze anders heel langzaam oplost en de hydrolyse dan ongelijkmatig verloopt. Dit bleek b.v. bij de volgende proef: 200 g niet fijn gewreven arabische gom werden in 300 cm³ 2%-ig zoutzuur opgelost en op 98° C. verhit. De polarisatie in een buis van 1 dm bedroeg: na 5 uren: 18.4° en na 6 uren: 19.2°. De opbrengst aan cordofanzuur bedroeg nu slechts 22 g. Daar de niet fijngewreven arabische gom langzaam oploste, werd eerst na 6 uren verhitten de opgegeven draaiing bereikt. Door dit lange verhitten werd echter een groot gedeelte van het cordofanzuur verder gehydrolyseerd tot in alcohol oplosbare producten, waardoor de lage opbrengst verklaard wordt.

Voor de bereiding van het aldobionzuur werd het cordofanzuur met 5%-ig zwavelzuur zolang gehydrolyseerd tot dit cordofanzuur niet meer met alcohol aangetoond kon worden. De concentraties van het cordofanzuur en het zwavelzuur waren gelijk aan die, welke bij de bereiding van glucuronzuur volgens WEINMANN gebezigd worden. Het eenige verschil was een kortere kookduur.

Het bleek ons, dat wij het cordofanzuur nog met alcohol aan konden toonen bij een concentratie, die 1/200 (1/2%) was van de oorspronkelijke concentratie, zooals die bij de hydrolyse toegepast werd; dit volgt uit de onderstaande proefneming.

1, 933 g cordofanzuur werden in 20 cm³ 0.98-n zwavelzuur opgelost (gelijke verhouding als bij de hydrolyse volgens de methode van F. WEINMANN). Van deze oplossing werden de volgende verdunningen gemaakt:

a.	5 cm ³	dezer oplossing	+	0 cm ³	0.98-n H ₂ SO ₄
b.	1 "	" "	+	4 "	" "
c.	1 "	" "	+	9 "	" "
d.	1 "	" "	+	19 "	" "
e.	1 "	" "	+	39 "	" "
f.	1 "	" "	+	99 "	" "
g.	1 "	" "	+	199 "	" "

Het cordofanzuur werd aangetoond, door bij 5 cm³ van zulk een oplossing 15 cm³ 96%-ige alcohol te voegen.

Het bleek, dat bij de oplossingen *a*, *b*, *c*, *d*, *e* en *f* onmiddellijk een wit neerslag of een witte troebeling ontstond. Bij de oplossing *g* ontstond na eenige minuten eveneens nog een duidelijke troebeling.

Voor de bereiding van het aldobionzuur werd nu 117 g cordofanzuur in een rondkolf met terugvloeiakoeler met 1170 cm³ 0.98-n zwavelzuur op een zandbad gekookt. Na 5 uren koken ontstond, bij toevoeging van 15 cm³ 96%-ige alcohol aan 5 cm³ der afgekoelde oplossing, slechts zeer weinig troebeling. Volgens bovenvermelde proefneming was dus slechts nog 0.5% van de oorspronkelijke concentratie aan cordofanzuur aanwezig. De hydrolyse werd nu beëindigd, waarna de verdere verwerking geschiedde op de wijze, die bij de bariumglucronaatbereiding beschreven zal worden. Er werd 50 g van een volkomen wit bariumzout verkregen. Het bariumgehalte bedroeg 15.8%.

Ter identificatie werd dit bariumzout verder gehydrolyseerd, waarbij bleek, dat er glucuronzuur en galactose ontstond. Bij de eerste hydrolyse was dus aldobionzuur ontstaan. Dit is in overeenstemming met het bariumgehalte, daar dit bij het bariumzout van aldobionzuur 16.2% bedraagt.

40 g van dit bariumzout werden gedurende 10 uren gehydrolyseerd met 400 cm³ 5%-ig zwavelzuur, waarna achtereenvolgens met bariumcarbonaat geneutraliseerd, gefiltreerd, met noriet ontkleurd en in vacuüm ingedampt werd. De met noriet ontkleurde oplossing werd in overmaat alcohol uitgegoten, waarbij het bariumglucronaat amorf neersloeg. Het filtraat werd volledig ingedampt, in een weinig water opgenomen en met broom geoxydeerd.

Er ontstond een kristallijn precipitaat van slijmzuur.

Deze proeven waren genomen na de eerste publicatie van WEINMANN, waarin hij nog onderstelde, dat het cordofanzuur aldobionzuur was. Oorspronkelijk vermoedden wij dan ook, dat wij het aldobionzuur met alcohol aantoonde en hadden deze proefnemingen ten

doel een nieuw criterium voor de beste kookduur bij de bereidingswijze van glucuronzuur op te sporen.

WEINMANN heeft n.l. als middel ter beoordeeling van de kookduur aangeraden de draaiing na te gaan (deze stijgt van $+ 0.7^\circ$ tot $+ 4.6^\circ$ in een buis van 1 dm).

Bij de hydrolyse ontstaan echter, zooals wij later zullen zien, ook vele ontledingsproducten, o. a. furfurol en pentanon-4-al-5-zuur, die de polarisatie beïnvloeden. Daarom zochten wij naar een ander criterium voor de kookduur en dachten, op grond van onze proeven oorspronkelijk, dat met een veel kortere hydrolyseduur (5 uren) kon worden volstaan. Hierbij bleek toen echter, zooals wij hierboven reeds mededeelden, het aldobionzuur te zijn ontstaan.

Uit het cordofanzuur werd door hydrolyse met 5%-ig zwavelzuur het bariumglucuronaat bereid.

150 g cordofanzuur werden in 1500 cm³ 0.95-n zwavelzuur opgelost. De polarisatie in een buis van 1 dm bedroeg: $+ 0.6^\circ$. De kleurlooze oplossing werd in een rondkolf met terugvloeiakoeler op een zandbad gekookt.

Na 3 uren koken was de kleur der oplossing helder geel geworden en bedroeg de polarisatie in een buis van 2 dm: $+ 4.1^\circ$. Na $5\frac{1}{2}$ uur koken was de kleur rood geworden en bedroeg de polarisatie: $+ 5.4^\circ$.

Na 15 uren koken werd de hydrolyse beëindigd¹⁾. De kleur der oplossing was bruinrood en de polarisatie in een buis van 2 dm bedroeg: $+ 8.7^\circ$.

Met aniline-acetaat ontstond een intensieve roodkleuring; er was dus furfurol ontstaan. Aan deze oplossing werd nu in de koude onder goede roering ondermaat bariet (225 g), in 2 l water van 40° C. opgelost, toegevoegd. Vervolgens werd met 50 g bariumcarbonaat volledig geneutraliseerd. Het filtraat werd gedurende $\frac{1}{2}$ uur met een weinig bariumcarbonaat en noriet op 70° C. verhit. Deze laatste behandeling diende om glucuronzuurlacton in het bariumzout van glucuronzuur om te zetten. De, na filtratie, heldere oplossing werd in vacuüm bij 35° C. tot 300 cm³ ingedampt.

Aan deze oplossing werd onder goed roeren alcohol toegevoegd, tot er een olieachtig neerslag ontstond. Het met noriet ontkleurde filtraat werd vervolgens voorzichtig in 2.5 l 96%-ige alcohol uitgegoten, waarbij het bariumglucuronaat als een amorfe stof neersloeg.

Het bariumzout werd gereinigd door het op te lossen in water en nogmaals uit te gieten in 96%-ige alcohol. Na affiltratie werd het product achtereenvolgens met 96%-ige alcohol, absolute alcohol en droge aether gewassen en in vacuüm boven zwavelvuur gedroogd. Het is een volkomen witte, amorfe stof.

Opbrengst: 24 g.

De opbrengst aan bariumglucuronaat is gering. Dit is te wijten aan de ontleding van glucuronzuur, die bij koken met 5%-ig zwavelzuur gedurende 15 uren plaats grijpt. K. P. LINK en C. NIEMANN

¹⁾ In sommige gevallen moest 20 uren gekookt worden, alvorens de draaiing constant was geworden.

(141) hebben hierover kwantitatieve proefnemingen verricht, waaruit blijkt, dat gedurende 15 uren koken met 1-n zwavelzuur 57.2% glucuronzuur ontleed wordt.

Uit het bariumglucuronaat werd het glucuronzuur bereid volgens de methode van F. Ehrlich en K. Rehorst (49, 55).

Bij de eerste, thans te beschrijven, proefnemingen kon het glucuronzuur niet kristallijn verkregen worden, maar werd het als een amorse, witte stof uit 96%-ige alcoholische oplossing met absolute alcohol en absolute aether neergeslagen.

Aan 33.7 g, in 150 cm³ water opgelost, bariumglucuronaat werd ondermaat zwavelzuur toegevoegd, waarna de oplossing onder goed roeren in 1200 cm³ 96%-ige alcohol werd gedruppeld. Hierbij sloeg het niet ontlede bariumglucuronaat neer. Het alcoholische filtraat werd in vacuüm ingedampt en in 96%-ige alcohol opgenomen. Na met noriet ontkleurd te hebben, lieten wij deze alcoholische oplossing, waaraan een gelijk volume absolute alcohol toegevoegd werd, in droge aether druppelen, waarbij een volkomen witte, amorse stof neersloeg, die afgefiltreerd en in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd werd.

De analyse van dit amorse zuur gaf de volgende resultaten:

Het amorse zuur bevatte, volgens de directe titratie met loog, 56% vrij glucuronzuur.

Voor de bepaling van het vrije en het als lacton aanwezige glucuronzuur werd een indirecte titratie uitgevoerd; deze verliep als volgt: 160.0 mg in weinig water opgelost amorf zuur werden in een Erlenmeyerkolf gebracht en door de oplossing werd een koolzuurvrije luchtstroom geleid, tot alle koolzuur uit de kolf verdwenen was. Vervolgens werd, na toevoeging van overmaat (7.23 cm³ 0.1244-n) loog gedurende 1/2 uur op het waterbad verhit. De oorspronkelijk kleurloze oplossing werd lichtgeel gekleurd. De overmaat loog werd met (0.78 cm³ 0.1092-n) zwavelzuur teruggetitreerd. Er was 0.817 cm³ 1-n loog verbruikt. Het amorf neergeslagen zuur bevatte dus totaal 95.1% glucuronzuur.

Het *vochtgehalte* van het amorse zuur werd bepaald door dit in vacuüm boven schalen met fosforpentoxyde en calciumoxyde bij 40° C. tot constant gewicht te drogen. Het *vochtgehalte* bedroeg 1.5%.

Het met aether neergeslagen zuur heeft dus de volgende samenstelling: 56% glucuronzuur, 39,1% glucuronzuurlacton en 1,5% vocht.

Bij het oplossen van gekristalliseerd glucuronzuur in water stelt zich, blijkens de literatuur, na geruime tijd een evenwicht in tusschen het zuur en het lacton, waarbij 60% zuur en 40% lacton aanwezig is.

Ook uit het voorafgaande volgt, dat bij onze glucuronzuurbereiding dit evenwicht bij benadering ontstaat en de beide componenten met aether volledig geprecipiteerd worden.

Elementairanalyse:

33.0 (35.0) mg amorf droog zuur gaven 48.1 (50.3) mg CO₂ en 15.8 (16.3) mg H₂O. Het zuur bevat dus: 39.6% C en 5.25% H.

Volgens berekening van de bij de titratie verkregen uitkomsten (vochtgehalte in rekening gebracht: 56.9% glucuronzuur en 39.7% glucuron), zouden wij bij de elementairanalyse van zuivere preparaten de volgende uitkomsten moeten verkrijgen: 38.7% C en 4.9% H.

Het amorf neergeslagen zuur heeft dus een te hoog koolstof- en waterstofgehalte, hetgeen er op wijst, dat daarin nog aldobionzuur aanwezig is.

Dit aldobionzuur heeft waarschijnlijk ook de uitkristallisatie van het glucuronzuur belemmerd. Na deze eerste proefnemingen hebben wij dan ook een wijziging in de bereidingsmethode aangebracht.

Het, op de volgens hiervóór geschetste wijze met alcohol geprecipiteerde, bariumglucuronaat werd in weinig water opgelost, aan welke oplossing zooveel alcohol toegevoegd werd, dat ongeveer $\frac{1}{3}$ van het oorspronkelijke gewicht aan bariumzout neersloeg.

Het filtraat werd nu in overmaat 96%-ige alcohol gedruppeld, waarbij het overige bariumzout als een witte, amorfe stof neersloeg. Uit dit gezuiverde bariumglucuronaat kon het glucuronzuur gemakkelijk gekristalliseerd verkregen worden.



MICROFOTOGRAFIE I.

Kristallen van glucuronzuur in gepolariseerd licht (vergrooting: 62 ×).

Hierbij werd een methode, die K. P. LINK (142) voor de bereiding van galacturonzuur aangegeven heeft, toegepast.

Aan een oplossing van 17 g gezuiverd bariumzout in 300 cm³ water werd 75 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd. Vervolgens lieten wij, onder goed roeren, uit een buret 100 cm³ 0.5-n zwavelzuur bijdruppelen. Nadat 55 cm³ zwavelzuur toegevoegd waren, werden nog 15 cm³ 96%-ige alcohol bijgegoten. Nadat alle zwavelzuur aanwezig was, werd overmaat alcohol (600 cm³) toegevoegd. Het neerslag werd afgefiltreerd en de oplossing met noriet ontkleurd. Het kleurloze filtraat werd in vacuüm tot 50 cm³ ingedampt. Aan deze oplossing werd opnieuw overmaat 96%-ige alcohol toegevoegd. Het filtraat werd nu, na ontkleuring met noriet, tot ongeveer 30 cm³ ingedampt en vervolgens in een kristalliseerschaltje in vacuüm boven zwavelzuur geplaatst. Na 1 dag kristalliseerde het glucuronzuur uit (zie microfotografie I).

Na affiltratie werd met weinig absolute alcohol en absolute aether gewasschen. Opbrengst: 3.5 g. Smpt., na omkristallisatie uit 96%-ige alcohol: 155° C. (smpt. glucuronzuur volgens EHRlich: 156° C.).

§ 2. Bereiding van glucuronzuur uit arabische gom volgens de tweede methode van F. Weinmann.

De glucuronzuurbereiding uit arabische gom volgens de tweede methode van WEINMANN werd eveneens door ons toegepast.

Volgens deze methode wordt de gom in éénmaal tot glucuronzuur gehydrolyseerd, zonder, zooals bij de eerste methode het geval is, een tusschenproduct te isoleren.

Wij hebben bij de tweede methode een langere kookduur dan WEINMANN toegepast.

500 g arabische gom (merk Cordofan) lieten wij gedurende 1 nacht in 1 l water zwellen. Vervolgens werden 23 cm³ geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd en werd de oplossing in een rondkolf met terugvloeikoeler gedurende 3 uren op het stoombad verhit. De oplossing werd van onzuiverheden en van het gevormde calciumsulfaat afgefiltreerd. Vervolgens werden 1310 cm³ 9%-ig zwavelzuur toegevoegd (zwavelzuur-concentratie: ± 7%) en werd de oplossing gedurende 20 uren gekookt. De verdere behandeling was analoog aan de in § 1 beschreven methode.

Na een gefractioneerde precipitatie van het bariumzout, kon hieruit het glucuronzuur kristallijn verkregen worden.

Deze tweede methode heeft een groote alcoholbesparing als voordeel. Daartegenover staat echter een kleiner rendement aan glucuronzuur, daar het uit een veel onzuiverder vloeistof geïsoleerd moet worden.

§ 3. Bereiding van glucuronzuur uit euxanthinezuur.

Het euxanthinezuur (133, 149, 249) vormt, aan calcium en magnesium gebonden, het hoofbestanddeel van de als „Indisch geel”

of „pioeri” in de handel gebrachte kleurstof. Dit product wordt uit de urine van, met mangabladeren gevoederde, koeien gewonnen. Het bestanddeel uit het mangabladd, dat de aanleiding is tot de vorming van Indisch geel, het euxanthoëen, is door A. L. VAN SCHERPENBERG (215) onderzocht. In het dierlijke lichaam ontstaat hieruit, door reductie van eenige hydroxylgroepen, euxanthon, dat in het lichaam aan glucuronzuur gepaard wordt en het euxanthinezuur geeft.

Het euxanthinezuur werd uit het Indisch geel volgens de methode van F. MANN en B. TOLLENS (149) bereid.

20 g pioeri werden in een mortier fijn gewreven en met overmaat 2-n zoutzuur behandeld. Na filtratie werd deze behandeling nog éénmaal herhaald. Het onoplosbare gedeelte is het euxanthinezuur. De zuivering van dit ruwe euxanthinezuur geschiedde door dit zuur in een ammoniumcarbonaatoplossing op te lossen (hierin is het euxanthinezuur wél, het euxanthon daarentegen niet oplosbaar). Uit deze oplossing werd het euxanthinezuur met zoutzuur in de vorm van lange, geelgekleurde naalden neergeslagen. Nadat het neerslag afgefiltreerd en met water uitgewassen was, werd deze behandeling nogmaals herhaald. Opbrengst: 9 g; smpt.: 160° C. (Smpt. euxanthinezuur volgens de literatuur: 162° C.).

Het euxanthinezuur wordt door hydrolyse gesplitst in euxanthon en glucuronzuur. Voor deze bereidingswijze van glucuronzuur worden in de literatuur verschillende methoden aangegeven.

De splitsing is door H. THIERFELDER (249) met waterdamp onder druk (120—125° C.) uitgevoerd. F. MANN en B. TOLLENS (149) pasten een hydrolyse met 10%-ig zwavelzuur bij 130—135° C. toe. Een analoge methode heeft C. NEUBERG (173) toegepast en wel: verhitting van euxanthinezuur met 2.5%-ig zwavelzuur op 135° C.

Het bleek ons echter, dat de splitsing reeds bij koken met 1.25%-ig zwavelzuur gedurende 15 uren, weliswaar niet volledig, doorgevoerd kon worden. Uit het bij de hydrolyse vrijgekomen glucuronzuur, dat als bariumzout geïsoleerd werd, kon het glucuronzuur gemakkelijk in kristallijne toestand verkregen worden.

Daar het euxanthinezuur zeer kostbaar is, werd van een kleine hoeveelheid uitgegaan.

5 g euxanthinezuur, opgelost in 250 cm³ 1.25%-ig zwavelzuur, werden gedurende 15 uren in een rondkolfje met terugvloeikoeler op een zandbad gekookt. Na afkoeling werd het afgescheiden euxanthon afgefiltreerd en het filtraat met bariumhydroxyde en bariumcarbonaat geneutraliseerd.

De verdere verwerking was geheel analoog aan de reeds tevoren vermelde bereiding.

Opbrengst: ongeveer 600 mg bariumglucronaat. Hieruit werden 240 mg glucuronzuur verkregen. Smpt., na omkristallisatie: 154—156° C.

§ 4. Bereiding van natriumglucuronaat.

H. THIERFELDER bereidde het natriumglucuronaat door omzetting van bariumglucuronaat met natriumsulfaat. Beter resultaat levert echter de methode van F. EHRLICH en K. REHORST (55), die een alcoholische glucuronzuuroplossing neutraliseeren met alcoholische natronloog. Deze werkwijze werd ook hier gevolgd.

2 g gekristalliseerd glucuronzuur werden in 80 cm³ 80%-ige alcohol opgelost. Hieraan werden, onder goed roeren en een weinig verwarmen, 106 cm³ 80%-ige alcoholische 0.0968-n natronloog toegevoegd. Na eenige tijd zette het natriumzout zich als kleine naaldvormige kristallen af. Deze werden met alcohol en droge aether gewasschen en in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd. Opbrengst: ongeveer 2 g.

Uit het amorfe glucuronzuur kon het natriumzout moeilijk gekristalliseerd verkregen worden. Daarom werd, wanneer van het amorfe zuur moest worden uitgegaan, een andere werkwijze toegepast, waarbij het natriumglucuronaat als een amorf, licht gekleurd poeder verkregen werd.

Aan 1306.5 mg, in 75 cm³ 90%-ige alcohol opgelost, amorf glucuronzuur werden, onder goed roeren, 22.5 cm³ 95%-ige alcoholische 0.091-n natronloog druppelsgewijze toegevoegd.

Er werd onmiddellijk een amorf, wit precipitaat gevormd, dat, na affiltratie, met absolute alcohol en droge aether gewasschen werd. Na drogen, in vacuüm boven schalen met calciumoxyde en zwavelzuur, is het een zeer licht gekleurd poeder.

Volgens deze methode werd ongeveer 15 g amorf natriumglucuronaat bereid.

§ 5. Inwerking van verdunde natronloog op glucuronzuurlacton.

Een glucuronzuurlactonoplossing werd verkregen door aan het, in 90%-ige alcohol opgeloste, amorfe glucuronzuur zooveel alcoholische natronloog toe te voegen, dat alle vrije zuur als natriumzout geprecipiteerd was, en daarna te filtreren. Wanneer nu aan de aldus verkregen glucuronzuurlactonoplossing opnieuw alcoholische natronloog werd toegevoegd, werd een geel gekleurd precipitaat gevormd, terwijl de bovenstaande oplossing eveneens *intensief geel* gekleurd was.

Volgens F. EHRLICH (55) zou deze gele kleur aan verharsing te wijten zijn. Dit staat echter ons inziens geenszins vast, daar de

gebezigde alcoholische natronloog slechts 0,1-n was en bij gewone temperatuur werd toegevoegd.

Ook de uitkomsten der in onderstaande tabel weergegeven proeven maken de verklaring, dat de gele kleur aan verharsing toegeschreven moet worden, onwaarschijnlijk.

TABEL II.

Kleur, die door verschillende toevoegingen aan de alkalische, alcoholische oplossing van glucuronzuurlacton ontstaat.	
5 cm ³ der geel gekleurde oplossing met 5 cm ³ water	Na eenige tijd verdween de kleur volkomen
5 " " " " " " " " " " 96%-ige alcohol	De volgende dag was een geelgroen precipitaat ontstaan
5 " " " " " " " " " " alcoholische glucuronzuuroplossing	Na eenige tijd werd een wit precipitaat gevormd; de bovenstaande oplossing was kleurloos
5 " " " " " " " " " " cm ³ aether	Er ontstond een geel precipitaat

Deze proeven wijzen veeleer uit, dat de gele kleur aan de vorming van een verbinding, analoog aan natriumalcoholaat, uit glucuronzuurlacton is toe te schrijven.

Samenvatting.

1e. Glucuronzuur werd uit arabische gom bereid volgens de beide methoden van F. WEINMANN, die eenigszins werden gewijzigd.

Het zuur werd in gekristalliseerde toestand verkregen.

2e. Bij inwerking van verdunde natronloog op het lacton van glucuronzuur werd een intensief geelgekleurde oplossing gevormd. Deze geelkleuring is waarschijnlijk aan alcoholaatvorming toe te schrijven.

HOOFDSTUK VI.

Bereiding van galacturonzuur.

§ 1. Bereiding van galacturonzuur uit citroenpectine volgens de methode van F. Ehrlich.

Uit de omvangrijke onderzoeken van F. EHRLICH en medewerkers is gebleken, dat galacturonzuur een belangrijke bouwsteen der pectine vormt. Door hydrolyse (50, 231) kan uit de pectine het *bariumgalacturonaat* verkregen worden. Hiertoe werd citroenpectine met 2%-ig zwavelzuur gedurende 10 uren gehydrolyseerd.

64 g citroenpectine werden in 4 l 2%-ig zwavelzuur opgelost en in een rondkolf met terugvloeikoeler gedurende 10 uren gekookt. De oorspronkelijk visceuze oplossing werd tijdens het koken dun vloeibaar, waarbij een neerslag ontstond. Dit neerslag loste bij verder hydrolyseeren weer in de vloeistof op. De kleur was na 10 uren koken geel geworden en er was furfural ontstaan. De met bariumcarbonaat geneutraliseerde oplossing werd gefiltreerd, waarna het bruinrood gekleurde filtraat met een weinig bariumcarbonaat en noriet op het waterbad verwarmd werd. Het filtraat werd in vacuüm tot ongeveer 500 cm³ ingedampt, waarna bij de nogmaals met noriet ontkleurde oplossing 3 l 96%-ige alcohol druppelsgewijze werden toegevoegd. Het gevormde precipitaat werd gezuiverd, door op te lossen in water en het nogmaals met alcohol te precipiteeren.

Het zoo verkregen neerslag werd, na affiltreeren, achtereenvolgens met 96%-ige alcohol, absolute alcohol en absolute aether gewasschen, waarna het bariumzout in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd werd.

Het was een lichtgeel gekleurd product. Opbrengst: 32 g. Vochtgehalte: 8.6%.

Het bariumgehalte van het droge bariumzout bedroeg: 26.4% (theoretisch: 26.3%).

Uit dit bariumgalacturonaat werd het galacturonzuur volgens Ehrlich bereid.

Aan 16 g, in weinig water opgelost, bariumgalacturonaat werden, bij kamertemperatuur 50 cm³ 0.98-n zwavelzuur toegevoegd. Nadat het gevormde neerslag afgefiltreerd was, werden aan de oplossing 4 l 96%-ige alcohol toegevoegd, ten einde het onontlede bariumgalacturonaat neer te slaan. Na filtratie werd de oplossing in vacuüm bij 35° C. ingedampt, doch het galacturonzuur kristalliseerde niet uit.

De pogingen om het galacturonzuur, volgens voornoemde bereidingsmethode afgescheiden, gekristalliseerd te verkrijgen, zijn mislukt. De volgende werkwijzen werden hierbij toegepast:

a. Het alcoholische filtraat werd in vacuüm bij 35° C. ingedampt en gedurende eenige dagen in een ijskast geplaatst.

b. Aan een warme 96%-ige alcoholische oplossing werd zooveel droge aether toegevoegd, dat een begin van troebeling optrad, waarna de oplossing tot 0° C. werd afgekoeld.

c. Aan een 96%-ige alcoholische oplossing werd zooveel absolute alcohol en aether toegevoegd, dat het galacturonzuur amorf neersloeg. Dit amorfe zuur werd in alcohol opgelost, in vacuüm tot een stroop ingedampt, waarna deze stroop in een ijskast werd geplaatst.

Wij hebben ons dus tevreden gesteld door het galacturonzuur op volkomen analoge wijze, als voor glucuronzuur beschreven is, met droge aether in amorfe toestand te precipiteeren.

De analyses van dit amorfe zuur gaven de volgende resultaten:

Volgens de *directe titratie* met loog bevatte het amorfe zuur 92.4% galacturonzuur.
Vochtgehalte: 2.4%.

Elementairanalyse:

34,8 (35.5) mg galacturonzuur gaven 48.8 (49.2) mg CO₂ en 17.0 (17.3) mg H₂O.
 Het amorfe product bevatte dus 38.1% C en 5.4% H.

Zuiver galacturonzuur bevat 37.1% C en 5.2% H.

Het amorfe galacturonzuur was, zoowel volgens de titratie als volgens de elementairanalyse, niet geheel zuiver. Het te hooge koolstof- en waterstofgehalte wijst, in verband met de bereidingswijze, op de aanwezigheid van koolhydraten.

§ 2. Bereiding van galacturonzuur uit polygalacturonide volgens de methode van K. P. Link.

K. P. LINK en medewerkers (140, 142) gaan bij de bereiding van galacturonzuur uit van polygalacturonide (zie hoofdstuk II), dat door de *California Fruit Growers Exchange*, Research Department, in de handel gebracht wordt. Zij geven een zeer nauwkeurige beschrijving van hun werkwijze. De overeenkomst met de voorgaande bereidingswijze is groot, doch de, door ons eveneens toegepaste, methode van LINK verschilt van de voorgaande in een zorgvuldiger en voorzichtiger uitvoering, b.v. vermindering van oververhitting en neutralisatie met bariumhydroxyde en weinig bariumcarbonaat in plaats van uitsluitend met bariumcarbonaat. Bij nauwkeurig navolgen van deze methode viel het ons niet moeilijk om het galacturonzuur in gekristalliseerde vorm te verkrijgen.

Door hydrolyse met 2,5%-ig zwavelzuur gedurende 15 uren en een

daarop volgende neutralisatie werd uit het polygalacturonide ¹⁾ het bariumberiumgalacturonaat bereid.

80 g polygalacturonide werden in een rondkolf met terugvloeiakoeler met 4 l 2.5%-ig zwavelzuur op een zandbad gekookt. Ter vermindering van stooten werden glazen kralen aan de vloeistof toegevoegd. Na 15 uren koken werd de hydrolyse afgebroken en de oplossing afgekoeld. Nadat de niet opgeloste fractie afgefilterd was, werd de oplossing gedeeltelijk geneutraliseerd met 290 g bariumhydroxyde, die in 2.5 l water van 40° C. opgelost waren. Deze barietoplossing werd langzaam en onder goed roeren aan de gehydrolyseerde polygalacturonide-oplossing toegevoegd.

Vervolgens werd met een kleine overmaat bariumcarbonaat volledig geneutraliseerd. Na filteren werd het filtraat in een rondkolf met 5 g noriet en 5 g bariumcarbonaat onder goed roeren op het waterbad tot 70° C. verhit en gedurende ongeveer 15 minuten op deze temperatuur gehouden. Nadat nogmaals met noriet ontkleurd was, werd de oplossing in vacuüm bij 35° C. tot 200 cm³ ingedampt. Deze ingedampte oplossing werd nogmaals ontkleurd en onder goed roeren in 1 l 96%-ige alcohol uitgegoten. Het neergeslagen bariumzout werd afgefilterd en achtereenvolgens met 96%-ige alcohol, absolute alcohol en droge aether gewassen. Het in vacuüm boven zwavelzuur gedroogde bariumzout heeft een bariumgehalte van 26.7%. Opbrengst: 28 gram.

Uit dit bariumberiumgalacturonaat kon het galacturonzuur gemakkelijk kristallijn verkregen worden.

Aan 32 g, in 600 cm³ water opgelost, bariumzout werden 100 cm³ 96%-ige alcohol (5) toegevoegd. Aan deze oplossing lieten wij onder goed roeren 104 cm³ 0.5-n zwavelzuur toevloeien.

Nadat 70 cm³ zwavelzuur toegevoegd was, werd een overeenkomstige hoeveelheid alcohol (15 cm³) bijgegoten. Nadat alle zwavelzuur toegevoegd was, werd nogmaals 600 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd.

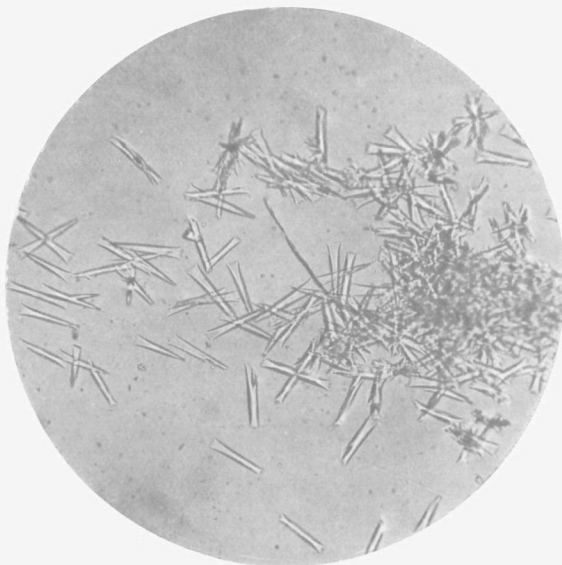
Het neerslag werd afgefilterd en de oplossing met 3 g noriet op 40° C. verhit. Het volkomen kleurloze filtraat werd vervolgens in vacuüm bij 35° C. tot ongeveer 50 cm³ ingedampt en daarna in 200 cm³ 96%-ige alcohol uitgegoten. Na filtratie en ontkleuring werd de oplossing in vacuüm tot 25 cm³ ingedampt. Deze ongekleurde dunne stroop werd in een kristalliseerschaltje in een vacuümexsiccator boven zwavelzuur geplaatst. De volgende dag was er een, uit kristallijne naalden gevormd, neerslag ontstaan (zie microfotografie II), dat na 3 tot 4 dagen in een vaste, witte kristalbrij veranderd was. Deze brij, werd op een Büchnerrechter afgezogen en achtereenvolgens met een weinig 96%-ige alcohol, absolute alcohol en droge aether gewassen. Opbrengst: ruim 4 g.

De kristallen sinteren bij 112° C. en smelten bij 159° C.

Uit de titratie bleek, dat dit gekristalliseerde galacturonzuur 1 molecuul kristalwater bevatte, dus de formule C₆H₁₀O₇ · H₂O had (α -galacturonzuur).

Uit dit α -galacturonzuur kon het watervrije β -galacturonzuur bereid worden door het α -zuur met absolute alcohol te koken. Bij afkoeling kristalliseerde de β -vorm in naalden uit. Smpt.: 160° C. (54).

¹⁾ Het polygalacturonide ontvingen wij van de genoemde maatschappij uit Californië.



MICROFOTOGRAFIE II.

Kristallen van galacturonzuur (vergrooting: 62 \times).

§ 3. Bereiding van natriumgalacturonaat uit galacturonzuur.

Uit het gekristalliseerde galacturonzuur kon het natriumgalacturonaat op volkomen analoge wijze, als voor natriumglucuronaat is beschreven, verkregen worden.

Uit het amorfe galacturonzuur gelukte dit niet. Met droge aether werd uit de alcoholische oplossing het natriumzout in amorfe toestand geprecipiteerd. Na oplossing van dit amorfe natriumzout in water en na eenige tijd staan in een vacuümexsiccator boven zwavelzuur, kristalliseerde het zuur tot een brij uit.

Samenvatting.

1e. Het galacturonzuur kon gemakkelijk uit polygalacturonide volgens de methode van K. P. LINK in kristallijne toestand bereid worden.

2e. De bereiding van galacturonzuur volgens F. EHRLICH uit citroenpectine gaf minder goede resultaten.

3e. Uit het galacturonzuur is het natriumgalacturonaat bereid en kristallijn verkregen.

HOOFDSTUK VII.

Bereiding der polymannuronzuren A en B (respectievelijk: algine- en fucinezuur).

§ 1. Nomenclatuur en gebezigd materiaal.

Zooals reeds in hoofdstuk III werd opgemerkt, heeft H. KYLIN twee, sterk op elkaar gelijkende, pectine-achtige stoffen uit algen bereid, die hij alginezuur en fucinezuur noemde.

Latere onderzoekers hebben echter bereidingswijzen toegepast, waarbij zij een mengsel van deze beide zuren verkregen.

Wij hebben de proefnemingen van KYLIN herhaald en de beide stoffen afzonderlijk bereid. Zij bleken beide uit dezelfde component opgebouwd te zijn en slechts zeer weinig van elkaar te verschillen. Daarom hebben wij de zuren polymannuronzuur A (alginezuur) en polymannuronzuur B (fucinezuur) genoemd, welke benamingen wij later zullen toelichten.

De onderzoekingen zijn alle verricht met zuren, geïsoleerd uit *Fucus serratus*. Het gebruikte materiaal was in 1923 verzameld, boven de centrale verwarming gedroogd en tot kleine stukjes fijn-gemalen. Ter contrôle werd ook van versch verzameld materiaal uitgegaan. Dit gaf dezelfde resultaten als het uit 1923 dateerende materiaal.

§ 2. Bereiding van een mengsel van polymannuronzuur A en B.

Voor de bereiding werd het voorschrift van W. L. NELSON en L. H. CRETCHER (169) met eenige wijzigingen gevolgd. Daartoe werden de wieren met verdund zoutzuur behandeld, ten einde de polymannuronzuren vrij te maken uit hun zouten. Daarna werden de poly-uronzuren met verdunde loog in oplossing gebracht. Op deze wijze wordt echter, zooals de genoemde onderzoekers beweren, niet uitsluitend alginezuur, doch een mengsel van algine- en fucinezuur, verkregen.

750 g gedroogd materiaal van *Fucus serratus* werden, na goed met leidingwater uitgewassen te zijn, met 12 l zoutzuur overgoten. De concentratie van het zoutzuur

in deze oplossing bedroeg ongeveer 0.5%. 10 cm³ der afgepipetteerde vloeistof verbruikten aanvankelijk: 10.3 cm³ 0.1197-n loog. Na 24 uren staan verbruikten 10 cm³ der vloeistof: 9.9 cm³ 0.1197-n loog. Het zoutzuur werd afgegoten¹⁾, waarna de algen opnieuw met 12 l 0.5%-ig zoutzuur behandeld werden. 10 cm³ verbruikten aanvankelijk: 13.2 cm³ 0.1197-n loog. Na 24 uren staan verbruikten 10 cm³: 13.1 cm³ 0.1197-n loog.

Het bleek dus, dat tweemaal uitwasschen met zoutzuur voldoende was. De wieren werden door een zeef afgegoten en goed met leidingwater uitgespoeld. Daarna werden de bladeren in 10 l 2.5%-ige soda-oplossing ondergedompeld. Onmiddellijk zwollen de wieren op en vielen geheel uiteen. De oplossing werd donker gekleurd. Na 24 uren staan werd de visceuze massa op een metalen zeef met fijne mazen gegoten, waarop de oplossing, na met eenige liters water verdund te zijn, kon afdruipe. Het op de zeef achtergebleven residu werd daarna opnieuw met 6 l 2.5%-ige soda-oplossing behandeld. Nadat de massa 24 uren had gestaan, werd weer door de fijnmazige zeef gefiltreerd.

De verzamelde filtraten werden tot 60° C. verhit en vervolgens in een centrifuge (doorsnede van de trommel: 50 cm, omwentelingen per minuut: 1200) door een laag noriet, die op het filterdoek aangebracht was, gecentrifugeerd. Deze laatste behandeling werd nog éénmaal herhaald.

De zoo verkregen, lichtgeel gekleurde, oplossing werd in een supercentrifuge (omwentelingen per minuut: 35.000) gecentrifugeerd, ten einde kleine onzuiverheden, zooals door het filterdoek heengeslagen noriet, te verwijderen. Aan dit kleurlooze filtraat werd onder goed roeren een kleine overmaat geconcentreerd zoutzuur toegevoegd, waardoor het algine- en fucinezuur in volumineuze vlokken neersloegen. Deze massa werd op neteldoek afgefiltreerd, met water uitgewasschen en gedurende 24 uren met 10 l 0.5%-ig zoutzuur behandeld. Deze extractie had ten doel asch- en oplosbare stikstofbestanddeelen te verwijderen. Deze zoutzuurbehandeling werd nog tweemaal herhaald, waarna het neerslag onder gedestilleerd water gebracht werd. Na 24 uren werd de vloeistof afgeschonken en de gel nogmaals met veel gedestilleerd water behandeld. Hierna werd de volumineuze gel achtereenvolgens met 8 l 45%-ige alcohol, 85%-ige alcohol en ten slotte met 96%-ige alcohol gedehydrateerd. Het aldus verkregen mengsel der polymannuronzuren was in droge toestand eenigszins grijs gekleurd. Opbrengst: 105 g, dus 14% van het algengewicht.

Het door neutralisatie vastgesteld aequivalentgewicht bedroeg 178.

Van uit andere porties algen bereid polymannuronzuur A en B varieerde het aequivalentgewicht van 176 tot 186. Het aequivalentgewicht voor een zuiver polyhexuronzuur bedraagt 176.

Hiernaast volgt een tabel met de, door andere onderzoekers gevonden, constanten van het mengsel algine- en fucinezuur.

¹⁾ Bij een andere proef werden de algen na deze behandeling met 80%-ige alcohol uitgetrokken en daarna weer met 0.5%-ig zoutzuur behandeld. Deze behandeling bleek echter niet noodzakelijk te zijn, daar ook zonder deze alcoholbehandeling even zuivere preparaten verkregen werden.

TABEL III.

Constanten van het mengsel der polymannuronzuren A en B			
Onderzoekers	Aeq. gewicht	$[\alpha]_D$ van natriumzout	Uronzuurgehalte door koolzuurbepaling
Hoagland en Lieb . . .	325	-169,2°	80%
Kylin		-136°	
Atsuki en Tomoda . . .	221	-130°	97%
Schmidt en Vocke . . .	185	-140°	
Ochi en Takahaski . . .	190		96—100%
Nelson en Cretcher . . .	176—184	-133°	
Colin	202	-134°	
Miwa	177—179	-133°	

§ 3. Bereiding van polymannuronzuur A.

Het polymannuronzuur A werd volgens de methode van H. KYLIN (130) bereid door algen met kokend water te extraheeren.

1000 g gedroogd materiaal van *Fucus serratus* werden gedurende 1 uur met 15 l water gekookt (door aanvulling met water werd het volume constant gehouden), waarna wij het gedurende 24 uren lieten staan.

Vervolgens werd door een zeef afgegoten en de vloeistof door een norietlaag in een groote centrifuge gecentrifugeerd. Aan de heldere, ongekleurde oplossing werd zooveel zoutzuur toegevoegd, dat er geen neerslag meer ontstond. Het gevormde neerslag was weer een waterrijke gel, die op neteldoek werd afgefiltreerd.

De verdere verwerking was volkomen analoog aan de voorgaande methode. In gedroogde toestand was het polyzuur een licht gekleurde, amorfe stof. Opbrengst: 50 g.

Het door neutraliseeren vastgestelde aequivalentgewicht varieerde van 176 tot 185.

Behalve door directe titratie, werd het aequivalentgewicht ook nog bepaald door het kaliumgehalte van het kaliumzout te bepalen. Dit kaliumzout werd bereid door alginezuur gedurende 24 uren in water te laten zwellen, waarna een kleine overmaat kaliloog werd toegevoegd. Uit deze oplossing werd het kaliumzout met alcohol geprecipiteerd en het werd door herhaalde omprecipitatie gezuiverd. Zodoende werd een volkomen wit kaliumzout van polymannuronzuur A verkregen. Van dit kaliumzout werd het kaliumgehalte vastgesteld door het kalium als sulfaat asch te wegen. Het kaliumzout bevatte 17,7% kalium (het theoretische gehalte van het zuivere zout bedraagt 18,2%).

§ 4. Bereiding van polymannuronzuur B.

Het fucinezuur werd volgens de methode, die door H. KYLIN (130) aangegeven is, bereid.

1000 g gedroogd materiaal van *Fucus serratus* werden gedurende 1 uur met 15 l water gekookt, waarna de vloeistof door een zeef met fijne mazen afgegoten werd. Deze behandeling werd nog tweemaal herhaald en diende om het polymannuronzuur A uit de wieren te extraheeren. Deze uitgetrokken wieren werden vervolgens op volkomen gelijke wijze verder verwerkt als voor de bereiding van het mengsel der beide poly-uron-zuren is aangegeven.

Het droge polymannuronzuur B was licht gekleurd. Opbrengst: 80 g. Het door neutraliseeren vastgestelde aequivalentgewicht varieerde, al naar de zuiverheid, van 176 tot 186.

Ook hier werd het aequivalentgewicht, behalve door titratie, vastgelegd door het kalium van het kaliumzout als sulfaat asch te bepalen. Het sulfaat aschgehalte bedroeg 18,4% (theoretisch 18,2%).

Van het door omprecipiteeren gezuiverde polymannuronzuur B werd een *aschgehalte* bepaald. Het aschgehalte varieerde, al naar de zuiverheid van het preparaat, van 0,8 tot 1,2%. In deze asch kon met magnesiamextuur *fosfaat* aangetoond worden.

Eigenschappen der polymannuronzuren. Het polymannuronzuur B werd door een jood-joodkaliumoplossing en verdund zwavelzuur intensief blauw gekleurd. Na toevoegen van geconcentreerd zwavelzuur werd de kleur bleekrood. Het polymannuronzuur A gaf deze kleuring niet. Met chloorzinkjood geven geen der beide zuren een kleuring te zien.

Het uiteenlopende gedrag ten opzichte van een jood-joodkaliumoplossing is het grootste verschil tusschen de beide polymannuronzuren.

Beide kunnen groote hoeveelheden water absorbeeren en vormen dan doorzichtige, zeer waterrijke, gels. Het polymannuronzuur B gelatineert iets beter dan het polymannuronzuur A.

Zowel het polymannuronzuur A als het polymannuronzuur B reduceeren FEHLING'S proefvocht heel weinig.

Beide zuren geven de naphtoresorcine-reactie en bij koken met 12%-ig zoutzuur furfurol en koolzuurontwikkeling. Bij toevoeging van een calciumnitraatoplossing aan een oplossing van het kaliumzout van polymannuronzuur A of B slaat het calciumzout van het polymannuronzuur, vooral dat van het polymannuronzuur B, als een volkomen doorzichtige, zeer waterrijke, gel neer.

De polymannuronzuren zijn sterker zuren dan azijnzuur, hetgeen blijkt uit het feit, dat de zuren oplossen in een natriumacetaat-oplossing en ook uit de omstandigheid, dat uit oplossingen der natriumzouten der polymannuronzuren met azijnzuur de polymannuronzuren niet geprecipiteerd worden.

Samenvatting.

1e. De polymannuronzuren A en B werden afzonderlijk en in zuivere toestand uit gedroogd materiaal van *Fucus serratus* volgens de methoden van KYLIN bereid.

2e. Van de zuren werden eenige eigenschappen vastgelegd.

3e. In de asch van polymannuronzuur B kon fosforzuur aangetoond worden.

HOOFDSTUK VIII.

Bereiding en identificatie van mannuronzuurlacton.

§ 1. **Bereiding van mannuronzuurlacton volgens de methode van W. L. Nelson en L. H. Cretcher.**

Zoowel het polymannuronzuur A als het polymannuronzuur B geven bij hydrolyse uitsluitend mannuronzuur, in tegenstelling met de opvatting van sommige onderzoekers (38, 170), die meenen, dat er meer dan één soort van uronzuur in het polyzuur aanwezig zou zijn.

Het mannuronzuur staat zeer gemakkelijk water af en gaat daarbij in het lacton over, zoodat wij bij de normale werkwijze steeds het lacton en niet het vrije zuur gekristalliseerd verkrijgen.

Voor de hydrolyse van het polymannuronzuur zijn verschillende voorschriften gegeven.

Zoo hydrolyseerden E. SCHMIDT en F. VOCKE (222) het polymannuronzuur (A + B) met 80%-ig zwavelzuur gedurende 48 uren bij kamertemperatuur. De verkregen reactievloeistof werd verdund tot de zwavelzuurconcentratie 4 tot 5% bedroeg, waarna gedurende 3 uren in een rondkolf met terugvloeikoeler gekookt werd. Het gelukte hun echter niet een gekristalliseerd lacton te bereiden. Uit het, na neutralisatie met bariumcarbonaat verkregen, bariumzout werd daarom een cinchoninezout (smpt.: 204° C.) bereid. T. MIWA (163) hydrolyseerde met 0,25-n zwavelzuur bij 145—147° C. gedurende 1,5 uur, doch ook hij kon het lacton niet gekristalliseerd verkrijgen.

De hydrolyse werd door ons in de eerste plaats uitgevoerd volgens de methode van W. L. NELSON en L. H. CRETCHER (169).

Een mengsel van polymannuronzuur A en B werd gedurende 5 dagen bij kamertemperatuur met 80%-ig zwavelzuur behandeld.

42 g gedroogd poly-uronzuur (A + B) werden gedurende 5 dagen bij kamertemperatuur met 120 g 80%-ig zwavelzuur behandeld. Het poly-uronzuur loste voor het grootste gedeelte op tot een zeer donkergekleurde oplossing. Daarna werd de vloeistof, onder goed roeren, in 1200 cm³ water uitgegoten. Nadat het onoplosbare gedeelte afgefiltreerd was, werd de oplossing tot koken verhit. Na afkoeling werd met bariumcarbonaat

geneutraliseerd. Het donker gekleurde filtraat werd gedurende 15 minuten met een weinig bariumcarbonaat en noriet op een waterbad verwarmd, waarna het, nu lichter gekleurde, filtraat in vacuüm tot ongeveer 100 cm³ werd ingedampt.

Er was een weinig neerslag ontstaan, dat werd afgefiltreerd, waarna de, bij het indampen weer donker gekleurde, oplossing met noriet werd ontkleurd. Het bariummannuronaat werd als een amorf zout neergeslagen door deze oplossing in 96%-ige alcohol te laten druppelen. Het afgefiltreerde precipitaat werd achtereenvolgens met 96%-ige alcohol, absolute alcohol en droge aether gewasschen.

Opbrengst: \pm 30 g. De kleur was licht bruin.

Vervolgens werd getracht om uit het bariumzout het lacton van mannuronzuur gekristalliseerd te verkrijgen.

Aan 7 g, in 200 cm³ water opgelost, bariumzout werden 35 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd. Het hierbij gevormde witte precipitaat was voornamelijk: onvoldoende gehydrolyseerd polymannuronzuur. In het filtraat werd onder goed roeren ondermaat (45 cm³ 0.45-n) zwavelzuur gedruppeld, waarna het gevormde bariumsulfaat afgefiltreerd werd. Het filtraat werd, na ontkleuring met noriet, in overmaat 96%-ige alcohol gedruppeld, waarbij het onontlede bariummannuronaat neersloeg. Het filtraat werd vervolgens in vacuüm bij 35° C. ingedampt, en in een kristalliseerschaltje in vacuüm boven zwavelzuur geplaatst. Noch het zuur zelf, noch het lacton kristalliseerde uit. Ook na toevoegen van warm ijsazijn en verdampen van het ijsazijn boven calciumoxyde kristalliseerde het lacton niet uit. Wél kon het lacton in amorfe toestand verkregen worden door de alcoholische oplossing daarvan in droge aether te laten druppelen. Zoo werd een amorfe, witte stof verkregen. Deze amorfe stof bevatte blijkens de titratie 95.2% mannuronzuur, of 86.5% mannuronzuurlacton.

De hydrolyse van het polymannuronzuurmengsel met 80%-ig zwavelzuur gaf onbevredigende resultaten.

Ook NELSON en CRETCHER konden langs deze weg rechtstreeks het lacton noch het zuur gekristalliseerd verkrijgen. Wel echter gelukte het hun kristallen van het lacton te isoleren, indien zij een zuivering toepasten door uit de, niet kristalliseerende, mannuronzuurstroop het cinchoninezout van mannuronzuur te bereiden (dat wel kristalliseert) en dit zout met bariet te ontleden (170). Dit is echter een omslachtige werkwijze, waarbij slechts een klein rendement wordt verkregen.

§ 2. Bereiding van mannuronzuurlacton volgens de methode van E. Schoeffel en K. P. Link.

SCHOEFFEL en LINK (223) voerden de hydrolyse op gelijke wijze uit, als bij de bereiding van galacturonzuur uit polygalacturonide werd aangegeven. Na de hydrolyse wordt echter een gefractioneerde precipitatie der bariumzouten toegepast. Bij gebruik van deze

methode konden wij — evenals de genoemde onderzoekers — het lacton in gekristalliseerde toestand verkrijgen.

Een mengsel van polymannuronzuur A en B werd gedurende 15 uren met 2,5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerd. Na neutraliseeren met bariet en bariumcarbonaat werd het bariumzout gefractionneerd geprecipiteerd.

50 g gedroogd polymannuronzuur (A + B) werden in een rondkolf met terugvloei-koeler gedurende 15 uren met 2.5 l 2.5%-ig zwavelzuur op een zandbad gekookt. Ten einde het stooten te voorkomen, werden glazen kogeltjes aan de vloeistof toegevoegd. Na afloop der hydrolyse werd de onoplosbare, niet gehydrolyseerde, fractie afgefiltreerd, waarna aan de oplossing ondermaat bariet (180 g bariet, opgelost in 1550 cm³ water van 40° C.) werd toegevoegd. Met 50 g, in water gesuspendeerd, bariumcarbonaat werd vervolgens volledig geneutraliseerd. Na filtratie werd de oplossing op het waterbad bij ongeveer 76° C. met 5 g noriet en 5 g bariumcarbonaat behandeld. Het aldus verkregen, lichtgeel gekleurde, filtraat werd in vacuüm bij 35—40° C. ingedampt tot ongeveer 250 cm³. De kleur der oplossing was nu roodbruin geworden en er was een weinig anorganisch neerslag ontstaan.

Na ontkleuren met noriet was de oplossing helder en iets geel gekleurd. Deze oplossing bevatte nu het bariummannuronaat en de oplosbare bariumzouten van gedeeltelijk gehydrolyseerde polymannuronzuren. Ten einde deze laatste te verwijderen, werd aan de oplossing bij 0—5° C. 20 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd. De oplossing bleef nog volkomen helder. Bij toevoeging van nog 5 cm³ alcohol werd zij troebel. Deze troebeling werd over noriet afgefiltreerd. Daarna werd nog eenige malen 5 cm³ alcohol toegevoegd en het gevormde neerslag afgefiltreerd.

Het filtraat werd vervolgens in 1250 cm³ 96%-ige alcohol gedruppeld.

Na eenige uren staan, werd het neergeslagen bariumzout afgefiltreerd, met 96%-ige alcohol, absolute alcohol en droge aether gewasschen, waarna het amorfe zout in vacuüm boven zwavelzuur werd gedroogd. Opbrengst: 24 g van een volkomen witte, amorfe stof.

Dit bariumzout reduceerde FEHLING's proefvocht niet in de koude, doch wel in de warmte.

Uit dit bariumzout kon het mannuronzuurlacton gemakkelijk gekristalliseerd verkregen worden (zie hieronder).

§ 3. Bereiding van mannuronzuurlacton volgens een eigen methode.

Bij de hydrolyse volgens de methode van SCHOEFFEL en LINK was het bezwaar, dat er nog oplosbare, niet volledig gehydrolyseerde, polymannuronzuren in oplossing bleven, die de kristallisatie van het lacton bemoeilijkten. Weliswaar werd dit bezwaar gedeeltelijk ondervangen door deze poly-uronzuren door gefractionneerde precipitatie met alcohol te verwijderen, doch dit ging niet volledig. Dat er, na die gefractionneerde precipitatie, nog polymannuronzuren aanwezig

waren, bleek duidelijk uit het bariumgehalte van het verkregen product. Dit bedroeg 27,8%, terwijl het gehalte theoretisch 26,3% moest zijn. Nu waren weliswaar ontledingsproducten met hoog bariumgehalte ontstaan, zooals dat ook bij glucuronzuur en galacturonzuur het geval was, doch bij de bereiding van galacturonzuur werd steeds een product verkregen, waarvan het bariumgehalte varieerde tusschen de 26,0% en 27,0% en was de verontreiniging dus van minder beteekenis.

Om deze onvolledig gehydrolyseerde producten te vermijden, hebben wij de methode van SCHOEFFEL en LINK gewijzigd.

Daartoe werd de hydrolyse na 12 uren koken onderbroken en werden de onoplosbare polymannuronzuren afgefiltreerd. In het filtraat kwamen dus, behalve het monomannuronzuur, nog oplosbare, slechts gedeeltelijk afgebroken, polymannuronzuren voor. Deze werden volledig gehydrolyseerd door nog 6 uren te koken. Bij deze tweede hydrolyse werden dus geen nieuwe, in water onoplosbare, polymannuronzuren gehydrolyseerd tot in water oplosbare polymannuronzuren. Deze methode gaf goede resultaten. Ten einde de goede zuurconcentratie te vinden, werd zoowel met 1,25%-ig als met 2,5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerd.

In de eerste plaats werd de proef uitgevoerd door polymannuronzuur A met 2,5%-ig zwavelzuur te hydrolyseeren.

50 g polymannuronzuur A werden gedurende 12 uren in een rondkolf met terugvloeiker met 2,5 l 2,5%-ig zwavelzuur op een zandbad gekookt. Na affiltreren van het onoplosbare gedeelte, werd de heldergeel gekleurde oplossing gedurende 6 uren verder gekookt. De verdere behandeling was analoog aan de in § 2 van dit hoofdstuk beschreven methode. Het verkregen bariumzout was volkomen wit.

Uit dit bariumzout kon het lacton gemakkelijk gekristalliseerd verkregen worden. Smeltpunt: 137—139° C. Uit 2 g bariumzout werden 250 mg lacton verkregen.

Evenzoo werden uit 80 g polymannuronzuur B, bij dezelfde werkwijze, ongeveer 30 g bariummannuronaat gewonnen, waaruit het lacton weer gemakkelijk kristallijn verkregen kon worden.

Bij de bereiding met 1,25%-ig zwavelzuur werden uit 80 g polymannuronzuur B 32 g volkomen wit bariumzout afgescheiden, waaruit het lacton weer gemakkelijk kristallijn verkregen kon worden.

De in § 2 bedoelde *bereiding van kristallijn mannuronzuurlacton* uit bariummannuronaat geschiedde volgens de methode van SCHOEFFEL en LINK (223).

Daartoe werd aan, in water opgelost, bariummannuronaat iets ondermaat zwavelzuur toegevoegd. Het onontlede bariummannuronaat werd met overmaat alcohol uit de oplossing neergeslagen. Het filtraat werd vervolgens in vacuüm tot een stroop ingedampt, die met warm ijsazijn (107) werd uitgetrokken, waarna de oplossing in vacuüm boven calciumchloride werd geplaatst. Het lacton kristalliseerde langzaam uit.

Dikwijls ontstond echter bij de toevoeging van ijsazijn een taai massa, waardoor de kristallisatie werd gehinderd.

In een latere publicatie hebben E. SCHOEFFEL en K. P. LINK (224) de methode dan ook in die zin gewijzigd, dat in plaats van ijsazijn, een mengsel van aceton en alcohol wordt gebezigd.

Vóór het uitkomen van deze laatste publicatie hadden wij echter reeds de eerste methode zoodanig gewijzigd, dat het genoemde bezwaar volledig ondervangen was en goede opbrengsten aan mannuronzuurlacton werden verkregen.

De uitvoering van de gewijzigde methode was als volgt:

Aan 2 g bariummannuronaat (bereid uit het mengsel der polymannuronzuren A en B met 2.5%-ig zwavelzuur) werd ondermaat (14.4 cm³) 2.5%-ig zwavelzuur uit een buret toegevoegd. Na affiltreren van het bariumsulfaat werd de oplossing in vacuüm tot ± 15 cm³ ingedampt, waarna overmaat alcohol aan de oplossing werd toegevoegd, ten einde het onontlede bariummannuronaat neer te slaan. De gevormde troebeling werd afgefiltreerd, waarna de oplossing in vacuüm geheel werd ingedampt.

Aan deze stroop werd een weinig, warm (*niet kokend*) ijsazijn toegevoegd, dat in vacuüm boven calciumoxyde en zwavelzuur verdampt werd. Bij dit indampen ontstond veelal een witte, taai massa. Vervolgens werden bij kamertemperatuur eenige cm³ alcohol toegevoegd, die goed met de taai massa vermengd werden.

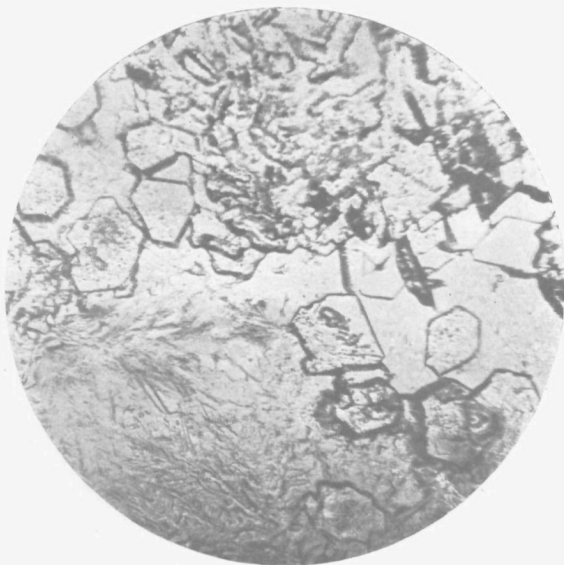
Dit mengsel werd bij 30—35° C. in een thermostaat verwarmd (niet op het stoombad, vanwege de mogelijkheid van oververhitting). Er had nu een spontane kristallisatie plaats, waarna wij de stroop in vacuüm boven calciumoxyde en zwavelzuur verder lieten uitkristalliseeren.

Opbrengst: 250 mg. Smpt.: 137—139° C.

Het mannuronzuurlacton kristalliseerde in dunne *zeshoekige plaatjes* uit, die alleen zwak polariseerden, als zij door hun smalle zijden werden waargenomen.

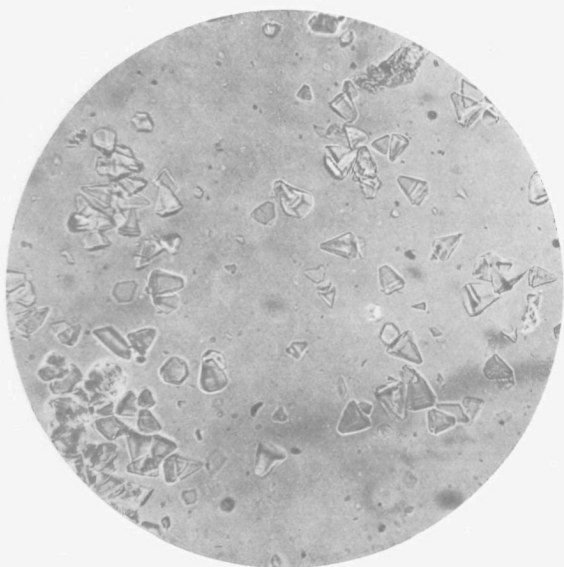
Bij *langzaam* uitkristalliseeren uit een onzuivere oplossing kristalliseerde het lacton in de vorm van *zeszijdige pyramiden* en van *afgeknotte zeszijdige pyramiden* uit (zie de microfotografieën III en IV). Deze kristallen polariseerden zwak, als ze waargenomen werden in een richting, die loodrecht staat op de as van de pyramide.

De kristallen zijn waarschijnlijk te beschouwen als in de dikterichting uitgroeide, zeszijdige plaatjes.



MICROFOTOGRAFIE III.

Kristallen van mannuronzuurlacton (vergrooting : 254 \times).



MICROFOTOGRAFIE IV.

Kristallen van mannuronzuurlacton bij langzame uitkristallisatie uit een onzuivere oplossing (vergrooting : 254 \times).

§ 4. Identificatie van het mannuronzuurlacton.

Het mannuronzuurlacton werd geïdentificeerd door het met broom tot mannosuikerzuur te oxydeeren en dit mannosuikerzuur als diamide, of als cinchoninezout, af te scheiden. De isoleering van het diamide van mannosuikerzuur geschiedde als volgt:

Een mannuronzuuroplossing werd met overmaat broom bij kamertemperatuur gedurende 6 dagen geoxydeerd. Vervolgens werd op het waterbad zoover ingedampt, dat er nog geen ontleding plaats vond. Ten einde het broomwaterstof volledig te verdrijven, werd weer water toegevoegd en opnieuw ingedampt, hetgeen nogmaals herhaald werd.

Bij toevoeging van ammoniak aan de gele stroop kristalliseerde na eenige tijd het diamide uit. Het precipitaat werd met koud water uitgewasschen en uit warm water omgekristalliseerd.

Smpt.: 188—190° C. (volgens literatuur moet het bedragen: 189° C.).

Om het mannosuikerzuur als cinchoninezout af te scheiden, werd als volgt te werk gegaan. De oplossing van mannosuikerzuur werd met bariumcarbonaat geneutraliseerd en met cinchoninesulfaat in het cinchoninezout omgezet. Smpt.: 221—222° C. (zie ook hoofdstuk IX, § 3).

Ook door oxydatie met broom uit mannose verkregen mannosuikerzuur gaf een cinchoninezout met hetzelfde smeltpunt.

§ 5. Bereiding van het vrije mannuronzuur.

Vervolgens werd getracht om, behalve het lacton, ook het *mannuronzuur zelf* gekristalliseerd te verkrijgen.

Ten einde van een volkomen zuiver bariumzout uit te gaan, werd bariummannuronaat uit het gekristalliseerde lacton bereid. Aan een oplossing van dit bariummannuronaat werd zooveel alcohol toegevoegd, dat juist een troebeling ontstond, waarna een kleine ondermaat zwavelzuur druppelsgewijze werd toegevoegd.

Na filtreren en toevoegen van overmaat alcohol werd de oplossing in vacuüm bij 25° C. ingedampt en vervolgens in een kristalliseerschaltje in vacuüm boven zwavelzuur geplaatst. Na eenige dagen kristalliseerde echter niet het vrije zuur, doch het lacton uit.

In de tweede plaats werd de methode van H. KILIANI, welke hij bij de bereiding van het vrije mannosuikerzuur bezigde, toegepast. Daartoe werd uit het bariumzout het zilverzout van mannuronzuur bereid. Aan dit zilverzout (250 mg) werd ondermaat 0,1-n zoutzuur (7 cm³) en overmaat alcohol toegevoegd. Na filtreren werd de

alcohol bij kamertemperatuur in vacuüm afgedampt. Er vormde zich een weinig neerslag, dat uit fijne naaldjes bestond. De opbrengst was echter voor een onderzoek te klein.

Na deze proefnemingen verscheen een publicatie van E. SCHOEFFEL en K. P. LINK (224), waarin deze onderzoekers meedeelden, dat zij het α - en β -mannuronzuur in kleine hoeveelheden gekristalliseerd verkregen hadden. Daar mijn onderzoek toen reeds was afgesloten, heb ik hiermede geen rekening kunnen houden.

§ 6. Kwantitatieve furfurolbepalingen van polymannuronzuren, van bariummannuronaat en van mannuronzuurlacton.

De furfurolbepalingen werden uitgevoerd volgens de methode van B. TOLLENS (3). Het, met 12%-ig zoutzuur overgedestilleerde, furfurol werd als furfurolphloroglucide afgescheiden en gewogen. In de onderstaande tabel zijn de uitkomsten vereenigd.

TABEL IV.

Furfurolbepalingen van polymannuronzuren, van bariummannuronaat en van mannuronzuurlacton		
Preparaat	mg Furfurolphloroglucide per 300 mg stof	Omgerekend op 300 mg mannuronzuur
Polymannuronzuur A	109,0	99,2
„ „ B	110,6	100,0
Bariummannuronaat B (2,5) .	63,5	86,1
„ „ B (1,25) .	66,6	90,2
Mannuronzuurlacton	107,7	97,7

In deze tabel beteekent „bariummannuronaat B (2.5)”, resp. „(1.25)”: bariummannuronaat, verkregen door polymannuronzuur B met 2.5%-ig, resp. met 1,25%-ig, zwavelzuur volgens de hiervóór beschreven methode te hydrolyseeren.

Uit deze tabel blijkt, dat de polymannuronzuren iets hogere uitkomsten gaven dan het gekristalliseerde lacton.

Dat de bariumzouten van het mannuronzuur lagere uitkomsten gaven, is vanzelfsprekend. Bij de hydrolyse ontstaan, zooals wij in hoofdstuk XIII zullen zien, ontledingsproducten, die zuur reageeren en geen furfurol geven.

Het bariumzout van het, met 1,25%-ig zwavelzuur gehydrolyseerde, polymannuronzuur B gaf een hogere opbrengst aan furfurolphloroglucide dan het met 2,5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerde polymannuronzuur B. Dit bewijst, dat er in het eerste geval minder ontledingsproducten bij de hydrolyse ontstaan zijn, dan in het tweede geval.

Dit zou er dus voor pleiten om bij de bereiding van mannuronzuur de hydrolyse van het polymannuronzuur liever met 1,25%-ig zwavelzuur dan met 2,5%-ig zuur uit te voeren. Wij zullen echter in hoofdstuk XI zien, hoe bij de gefractioneerde scheiding der cinchoninezouten bleek, dat in het met 1,25%-ig zwavelzuur bereide zuur nog niet geheel afgebroken, oplosbare polymannuronzuren aanwezig waren, hetgeen niet het geval was met het product, verkregen bij de hydrolyse met 2,5%-ig zwavelzuur. Daarom wordt aan deze laatste concentratie van het zuur voor de bereiding de voorkeur gegeven.

Samenvatting.

1e. Voor de bereiding van mannuronzuurlacton werden de polymannuronzuren op verschillende wijzen gehydrolyseerd.

2e. Er werd een bereidingswijze voor bariummannuronaat uitgewerkt, waarbij de polymannuronzuren met 2,5%-ig zwavelzuur in 2 étappes gehydrolyseerd werden. Uit het daarbij verkregen bariumzout kon het mannuronzuurlacton gemakkelijk gekristalliseerd afgescheiden worden.

3e. Het mannuronzuurlacton werd geïdentificeerd door het te oxydeeren en het gevormde oxydatieproduct als diamide en als cinchoninezout af te scheiden.

4e. Vervolgens werd getracht om het vrije zuur zelf kristallijn te verkrijgen. De kleine opbrengst maakte echter een identificatie der kristallen onmogelijk.

HOOFDSTUK IX.

Bereiding en identificatie van fucoïdinezuur.

§ 1. Bereiding en eigenschappen van fucoïdinezuur.

Het fucoïdinezuur werd uit het, uit 1923 dateerende, in het laboratorium voor Technische Botanie voorbehandelde, materiaal van *Fucus serratus* volgens de methode van H. KYLIN (130) bereid.

Daartoe werden de algen met kokend water geëxtraheerd. Het hierbij opgeloste polymannuronzuur A werd door toevoeging van bariumacetaat als bariumzout geprecipiteerd. Vervolgens werd het bariumzout van fucoïdinezuur met alcohol uit de oplossing neergeslagen.

1000 g gedroogd materiaal van *Fucus serratus* werden gedurende 5 uren met 15 l water in een koperen kookpan gekookt en vervolgens door een zeef met fijne mazen afgefilterd. Het waterige extract werd gezuiverd door de oplossing te centrifugeeren door een laag noriet, dat op het filterdoek was aangebracht. Aan het heldere filtraat werd nu, onder goed roeren, overmaat bariumacetaat (750 g) als geconcentreerde oplossing toegevoegd. Nadat het gevormde neerslag afgefilterd was, werd aan de oplossing 6 l 96% -ige alcohol toegevoegd, waardoor het bariumzout van fucoïdinezuur amorf neersloeg. Dit neerslag werd met 96% -ige alcohol gewasschen en in vacuüm gedroogd. Het product was bruin gekleurd. Opbrengst: 60 g.

Dit bariumzout werd gezuiverd door met overmaat water ongeveer 1 uur te koken, af te filteren en met noriet te ontkleuren.

Bij toevoeging van de helft van het volume aan 96% -ige alcohol ontstond een opalescentie, doch geen neerslag. Er vormde zich bij toevoeging van een weinig natriumchloride onmiddellijk een precipitaat. Het verkregen bariumzout loste gemakkelijk in koud water op, waaruit het nogmaals met alcohol en natriumchloride geprecipiteerd werd. Zoo werd een lichtbruin gekleurd amorf product verkregen.

Van dit omgeprecipiteerde product werden vervolgens verschillende eigenschappen nagegaan.

Kwalitatief:

a. De α -naphtholreactie van MOLISCH viel positief uit.

b. De reactie van ROSENTHALER op methylpentose gaf een positief resultaat.

* Daartoe werd een weinig der stof gedurende 10 minuten in een reageerbuis met 10 cm³ geconcentreerd zoutzuur en 2 cm³ aceton op het waterbad verhit. De oplossing werd intensief rood gekleurd.

c. De phloroglucine-zoutzuur-reactie gaf een zwak positieve uitkomst.

Hiertoe werd een weinig der stof met 12%-ig zoutzuur en phloroglucine korte tijd (ca. 1 minuut) in een reageerbuis in de vlam verhit. Bij aanwezigheid van pentosen of van hexuronzuren krijgt de oplossing een roodviolette kleur.

Volgens H. KYLIN geeft het fucoidinezuur een positieve phloroglucine-zoutzuur-reactie.

Uit verschillende porties zee-algen bereid, bariumzout van fucoidinezuur bleek echter slechts een zeer zwakke phloroglucine-zoutzuur-reactie te geven.

d. De naphtoresorcine-reactie, toegepast met uitschudden met benzol, gaf een zwak positief resultaat.

e. FEHLING's proefvocht werd, ook bij koken, niet gereduceerd.

f. De stof ontkleurde een kaliumpermanganaatoplossing zelfs reeds een weinig in de koude.

Kwantitatief:

a. Bariumgehalte. Het gemiddelde van de uitkomsten van drie bariumbepalingen volgens de gangbare methode bedroeg 20,3% barium.

Het bariumgehalte werd ook bepaald uit het sulfaatashgehalte. Op deze wijze werd 24,3% barium gevonden.

Het bariumzout van fucoidinezuur was dus verontreinigd met andere metalen. Deze verontreinigingen zijn voornamelijk aan alkalizouten te wijten. Bij de extractie der zeewieren met kokend water lost namelijk het alkalizout van fucoidinezuur in water op. Aan deze oplossing wordt vervolgens bij de bereiding bariumacetaat toegevoegd. Bij toevoeging van alcohol slaat nu het bariumzout van fucoidinezuur, doch gedeeltelijk ook het natriumzout van fucoidinezuur, uit de oplossing neer.

b. Furfurol- en methylfurfurolbepaling. Deze bepalingen werden uitgevoerd volgens de methode van W. B. ELLET (79a). Zij berust op de eigenschap, dat methylfurfurolphloroglucide oplosbaar is in alcohol terwijl furfurolphloroglucide practisch onoplosbaar daarin is.

303.4 (411.0) mg stof gaven 57.5 (81.8) mg (furfurol + methylfurfurol) - phloroglucide. Na extractie met 96%-ige alcohol resteerden 17.7 (25.0) mg furfurolphloroglucide.

De stof bevatte dus 28.1% methylpentose en 7.6% pentose.

Inderdaad bevatte het bariumzout dus pentose, of althans een

product, dat bij koken met 12%-ig zoutzuur furfurol gaf, hoewel de phloroglucine-zoutzuur-reactie slechts zwak positief uitviel.

c. Methoxylbepaling. Van het bariumzout werd een methoxylbepaling volgens ZEISEL uitgevoerd.

Het bariumzout van fucoidinezuur bleek echter geen methoxyl te bevatten.

§ 2. Oriëntering omtrent de hydrolyseproducten van fucoidinezuur.

Ten einde de samenstelling van het fucoidinezuur na te gaan, werden de hydrolyseproducten daarvan onderzocht.

Daartoe werd het fucoidinezuur gedurende verschillende tijden (varieerende tusschen 10 en 17 uren) met 5%-ig zwavelzuur gekookt.

25 g bariumzout van fucoidinezuur werden gedurende 10 uren met 750 cm³ 5%-ig zwavelzuur in een rondkolf met terugvloeikoeler op een zandbad gekookt. De oplossing was na afloop der hydrolyse licht roodbruin gekleurd. Na neutralisatie met bariumcarbonaat werd het neerslag afgefiltreerd en het filtraat met een weinig bariumcarbonaat en noriet op het waterbad bij 70—80° C. verhit. Het lichtgeel gekleurde filtraat werd in vacuüm bij 35° C. tot ± 100 cm³ ingedampt. Bij dit indampen werd een neerslag gevormd, dat in dit geval niet onderzocht werd.

Na filtratie werd met overmaat 96%-ige alcohol het bariumzout van het gehydrolyseerde product van fucoidinezuur uit de oplossing geprecipiteerd, afgefiltreerd achtereenvolgens met 96%-ige alcohol, absolute alcohol en droge aether gewasschen en vervolgens in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd. Opbrengst: 3 g.

Van dit bariumzout van het gehydrolyseerde product van fucoidinezuur konden de volgende eigenschappen worden vastgesteld.

Kwalitatief:

a. De α -naphtholreactie van MOLISCH gaf een positief resultaat.
 b. De reactie van ROSENTHALER op methylpentosen was negatief.
 c. De phloroglucine-zoutzuur-reactie leverde een zwak positief resultaat.

d. De reactie van EHRLICH (58) op galacturonzuur gaf een negatieve uitkomst.

Met basisch loodacetaat werd een wit neerslag gevormd, dat bij verhitting geel tot lichtbruin werd.

e. De naphtoresorcine-reactie viel negatief uit bij uitschudden met benzol, en zwak positief bij uitschudden met aether.

f. FEHLING's proefvocht werd niet bij kamertemperatuur, echter wel bij verwarming, gereduceerd.

g. Een kaliumpermanganaatoplossing werd reeds een weinig in de koude ontkleurd.

- h. De diazo-reactie gaf een positief resultaat.
- i. Met ferrichloride ontstond een sterke roodkleuring.
- j. Bij verhitting met loog trad een gele kleur op.
- k. Het bariumzout gaf met p-nitrophenylhydrazine, in 50%-ige ijsazijn opgelost, na eenige tijd een neerslag.

Uit de hierboven opgesomde eigenschappen volgt, dat het, bij de hydrolyse van fucoidinezuur verkregen, product een carbonylzuur is.

Ten einde na te gaan, of de carbonylgroep een aldehyde- of een ketogroep is, hebben wij de oxydatiesnelheid van het zuur vergeleken met de oxydatiesnelheid van glucuronzuur, van glucose en van xylose.

Daartoe werden deze stoffen in water opgelost en met overmaat broom bij kamertemperatuur behandeld. Het bleek, dat de glucose- en de glucuronzuuroplossing reeds na eenige dagen geoxydeerd waren. De oplossingen reduceerden dan n.l. FEHLING'S proefvocht niet meer.

Na 9 dagen bleek de, met broom behandelde, xylose-oplossing FEHLING'S proefvocht nog een weinig te reduceeren. De oplossing van het, met broom behandelde, carbonylzuur reduceerde na 9 dagen daarentegen FEHLING'S proefvocht nog zeer sterk.

Het bij de hydrolyse van fucoidinezuur geïsoleerde carbonylzuur is dus zeer waarschijnlijk een *keto*zuur.

Ook de overige eigenschappen wijzen in deze richting. Zoo was b.v. de diazoreactie sterk positief. Onmiddellijk trad een intensieve roodkleuring op, terwijl deze kleuring bij de hexuronzuren pas na eenige tijd optrad. Bij verhitting met basisch loodacetaat krijgen wij niet zulke sterke kleuringsverschijnselen te zien, als onder deze omstandigheden met de hexuronzuren het geval is.

Kwantitatief:

- a. Het *bariumgehalte* bedroeg 29,9%.

Van andere porties varieerde het bariumgehalte, al naar de kookduur, van 29,9% tot 33,5%.

- b. *Furfurol- en methylfurfurolbepaling.*

274.5 mg bariumzout gaven 20.0 mg (furfurol + methylfurfurol)-phloroglucide. Na extractie met 96%-ige alcohol resteerden 17.1 mg furfurolphloroglucide. Het bariumzout bevatte dus 8.4% pentose en practisch geen methylpentose. Men bedenke hierbij, dat ook furfurolphloroglucide een weinig in warme 96%-ige alcohol oplost.

Het zure hydrolyseproduct geeft dus bij koken met 12%-ig zoutzuur meer furfurol dan het fucoidinezuur. Dit wijst er op,

dat de furfurol waarschijnlijk niet van pentose, maar van het carbonylzuur zelf afstamt.

Behalve de beschreven hydrolyse met 5%-ig zwavelzuur, hebben wij 40 g fucoïdinezuur nog gehydrolyseerd met 4 l 2,5%-ig zwavelzuur gedurende 12 uren.

Na neutraliseeren met bariumcarbonaat en na ontkleuren van het filtraat met noriet, hebben wij aan de oplossing 6 l 96%-ige alcohol toegevoegd. *Hierbij sloeg een witte, amorfe stof uit de oplossing neer, waarvan wij eenige eigenschappen hebben nagegaan.*

De stof gaf met zoutzuur een weinig koolzuurontwikkeling. Dit koolzuur is waarschijnlijk afkomstig van iets opgelost, of van fijn gesuspendeerd, carbonaat.

De eigenschappen van het bariumzout waren de volgende:

- a. Het bariumzout was in water practisch onoplosbaar.
- b. Het daaruit bereide calciumzout was in water practisch onoplosbaar.

Het bariumzout werd met een weinig zwavelzuur ontleed. Bij neutralisatie met calciumhydroxyde werd een wit precipitaat gevormd.

- c. De reactie van DENIGÈS gaf een duidelijk positief resultaat.
- d. De stof reduceerde FEHLING'S proefvocht niet.
- e. De diazo-reactie viel positief uit.
- f. Een kaliumpermanganaatoplossing werd bij verhitting ontkleurd.
- g. De stof gaf met loodacetaat en met zilvernitraat witte, amorfe precipitaten.

Deze eigenschappen stemmen volkomen overeen met die van citroenzuur. Een kwantitatieve bariumbepaling werd niet verricht.

Het alcoholische filtraat, dat wij bij deze laatste bereiding verkregen hadden, bevatte dus nog het bariumzout van het carbonylzuur.

De oplossing werd in vacuüm bij 25° C. tot een klein volume ingedampt. Na ontkleuring der oplossing met noriet, werd de oplossing in overmaat 96%-ige alcohol uitgegoten. Hierbij werd een wit, amorf precipitaat gevormd van het bariumzout van het carbonylzuur. Het product gaf dezelfde reacties als het product, dat verkregen werd bij de hydrolyse van fucoïdinezuur met 5%-ig zwavelzuur.

Alleen viel de naphtoresorcine-reactie positief uit, indien wij de gewone uitvoering eenigszins wijzigden (zie hoofdstuk XV, § 3).

Kwantitatieve bepalingen zijn van dit product nog niet verricht.

Afscheiding van fucose als een der hydrolyseproducten van fucoïdinezuur.

Aangezien bij de hiervóór beschreven waarnemingen gebleken was, dat een der componenten het fucoïdinezuur een methylpentose was, werd thans tot isoleering van die suiker overgegaan.

Uitgangspunt was het alcoholische filtraat, dat verkregen werd bij de alcoholtoevoeging aan het gehydrolyseerde en met bariumcarbonaat geneutraliseerde fucoïdinezuur.

De in vacuüm ingedamppte oplossing reduceerde FEHLING's proefvocht en gaf de reactie van ROSENTHALER op methylpentose. Daarentegen gaf de phloroglucine-zoutzuur-reactie een negatief resultaat.

Met p-broomphenylhydrazine werd een wit kristallijn neerslag gevormd, dat uit dunne naaldjes bestond. Na omkristallisatie uit 30%-ige alcohol bedroeg het smeltpunt van deze naaldjes 172—174° C. De methylpentose was dus fucose (smpt. van het p-broomphenylhydrazon van fucose volgens de literatuur: 176° C.).

Uit de alcoholische oplossing werd het fucose in kristallijne toestand als volgt bereid:

Het alcoholische filtraat, verkregen bij de hydrolyse van fucoïdinezuur, werd in vacuüm volledig ingedampt en in water opgenomen.

Na ontkleuren met noriet, werd een overmaat zoutzure phenylhydrazine en natriumacetaat toegevoegd. Na 24 uren staan bij kamertemperatuur werd het uitgekristalliseerde fucose-phenylhydrazon afgefiltreerd.

± 3 g fucosephenylhydrazon werden met 2.4 g benzaldehyde, 25 cm³ 96%-ige alcohol en 15 cm³ water in een rondkolfje met terugvloekoeler gedurende 5 uren op het waterbad verhit. Bij afkoeling kristalliseerde het benzaldehydephenylhydrazon uit. Nadat de alcohol in vacuüm bij 35° C. afgedampt was, werd eenige malen met aether uitgeschud, ten einde de overmaat benzaldehyde en benzoëzuur te verwijderen. De oplossing werd in vacuüm tot een dunne stroop ingedampt, en in een kristalliseerschaaftje in vacuüm boven zwavelzuur geplaatst.

Na enten ¹⁾ kristalliseerde de fucose na eenige tijd uit. Zoo werd 1 g fucose verkregen. Smpt.: 144° C. (Smpt. fucose, volgens de literatuur: 144—145° C.).

Samenvatting van § 2.

Bij de zure hydrolyse van fucoïdinezuur werden als hydrolyseproducten gevonden:

1e. een methylpentose, die fucose bleek te zijn. De fucose werd kristallijn afgescheiden,

¹⁾ De entkristallen van fucose, evenals die van de later te bespreken lyxose, werden mij door Prof. J. J. BLANKSMA te Leiden verstrekt, waarvoor ik hem hierbij mijn dank betuig.

- 2e. een carbonylzuur, dat zeer waarschijnlijk een keto-zuur is. Van dit keto-zuur werden verschillende reacties nagegaan,
 3e. een zuur, dat in alle onderzochte reacties overeenstemde met citroenzuur.

§ 3. Onderzoek naar de aard van het carbonylzuur, dat bij de hydrolyse van fucoïdinezuur gevormd wordt.

Daar een der hydrolyseproducten van fucoïdinezuur een carboxylgroep, een carbonylgroep en, zooals wij bij de bespreking van het oxydatieproduct zullen zien, één of meer hydroxylgroepen bevat, was de mogelijkheid niet uitgesloten, dat wij met een penturonzuur te maken hadden. Het is niet waarschijnlijk, daar de oxydatieproeven een keto-zuur waarschijnlijk maakten. Om de aanwezigheid van een penturonzuur nader te onderzoeken, hebben wij het carbonylzuur geoxydeerd en het verkregen oxydatieproduct met de oxydatieproducten van verschillende pentosen vergeleken.

In de eerste plaats werd gezocht naar een gemakkelijke methode om de, bij de laatstbedoelde oxydaties optredende, trioxyglutaar-zuren aan te toonen. Die bleek te kunnen bestaan uit het afscheiden der cinchoninezouten, al liggen de smeltpunten van de cinchoninezouten der diverse trioxyglutaar-zuren dicht bij elkaar.

Het cinchoninezout van het geoxydeerde carbonylzuur werd als volgt bereid:

Het bariumzout van het genoemde carbonylzuur werd in waterige oplossing met overmaat broom gedurende 5 dagen bij kamertemperatuur geoxydeerd. Vervolgens werd de oplossing op het waterbad zoover ingedampt, dat er nog geen ontleding plaats greep. Om het broomwaterstof volledig te verdrijven, werd eenige malen water toegevoegd en op het waterbad ingedampt.

Vervolgens werd met bariumcarbonaat geneutraliseerd. Het filtraat, dat het bariumzout van het geoxydeerde zuur bevatte, werd tot het kookpunt verhit. Vervolgens werd ondermaat, in een mortier goed fijn gewreven, cinchoninesulfaat toegevoegd. Na $\frac{1}{2}$ tot 1 minuut koken werd snel gefiltreerd. Bij afkoelen van het filtraat kristalliseerde het cinchoninezout van het geoxydeerde carbonylzuur dadelijk uit.

Het smeltpunt van dit geoxydeerde carbonylzuur bedroeg, na omkristallisatie uit warm water: 204°C .

Op analoge wijze werden door ons uit de bekende pentosen de trioxyglutaar-zuren, $\text{COOH}-(\text{CHOH})_3-\text{COOH}$, bereid. Deze trioxyglutaar-zuren werden als cinchoninezouten afgescheiden.

Uit d-xylose, d-lyxose en l-arabiose werden resp.: d-xylotrioxo-

glutaarzuur, d-arabotrioxylutaarzuur en l-arabotrioxylutaarzuur verkregen.

De smeltpunten der cinchoninezouten dezer zuren waren resp.: 227° C., 221° C. en 223° C.

Het carbonylzuur kon dus niet xyluronzuur, lyxuronzuur of arabinuronzuur zijn.

Daar ons ribose niet ter beschikking stond, hebben wij geen cinchoninezout van ribotrioxylutaarzuur kunnen bereiden. Doch het is onwaarschijnlijk, dat wij in het carbonylzuur een riburonzuur hebben te zien. Immers, daar de uronzuren in de planten zeer waarschijnlijk uit de overeenkomstige suikers ontstaan, zullen de in het plantenrijk aan te treffen penturonzuren vermoedelijk xyluronzuur of arabinuronzuur zijn.

Wij hebben nog eenige eigenschappen van het geoxydeerde carbonylzuur vastgesteld en een kwantitatieve stikstofbepaling van het cinchoninezout verricht.

Van het cinchoninezout van het oxydatieproduct van het carbonylzuur werd het *stikstofgehalte* bepaald. Van 3 bepalingen waren de uitkomsten: 7,1%, 7,1% en 7,5%. Het cinchoninezout bleek geen kristalwater te bevatten.

Verder werden van het oxydatieproduct van het carbonylzuur eenige *kwalitatieve reacties* nagegaan. Daartoe werd het cinchoninezout in warm water opgelost en met iets overmaat bariet ontleed. Na afkoeling werd het uitgekristalliseerde cinchonine afgefiltreerd en de overmaat bariet met koolzuur verwijderd.

Het verkregen bariumzout gaf de volgende reacties:

- a. Geen reductie van FEHLING's proefvocht.
- b. Een kaliumpermanganaatoplossing werd in de koude ontkleurd.
- c. Het bariumzout was goed in water en in alcohol oplosbaar.
- d. De reactie van DENIGÈS gaf een negatief resultaat.
- e. De diazo-reactie viel negatief uit.
- f. Met ferrichloride ontstond geen roodkleuring.
- g. Het vrije zuur gaf geen kristallijn sublimaat. Er werden dampen gevormd, die als vloeistofdruppels condenseerden. Deze druppels reageerden zuur, gaven met ferrichloride een roode kleur en ontkleurden een kaliumpermanganaatoplossing.

Verder werden nog de reacties van het geoxydeerde product van het carbonylzuur vergeleken met die van malonzuur, barnsteenzuur,

glutaarzuur, appelzuur, wijnsteenzuur en citroenzuur. Met geen enkele der hier genoemde zuren bleek het echter identiek te zijn.

Als resultaat van deze proeven kunnen wij alleen zeggen, dat het zure, FEHLING's proefvocht reduceerende, hydrolyseproduct van fucoïdinezuur een keto-oxy-zuur is.

Samenvatting.

1e. Uit gedroogd materiaal van *Fucus serratus* werd, volgens de methode van H. KYLIN, fucoïdinezuur bereid.

Uit de analyse van het bariumzout bleek, dat deze bereidingswijze een onzuiver product gaf.

2e. Uit de reacties, die het fucoïdinezuur, de hydrolyseproducten van fucoïdinezuur en het oxydatieproduct van het zure, FEHLING's proefvocht reduceerende, hydrolyseproduct van fucoïdinezuur gaven, bleek, dat het fucoïdinezuur is samengesteld uit fucose, die kristallijn afgescheiden kon worden, en twee zuren.

Een der zuren geeft alle daarop onderzochte reacties van citroenzuur.

Het andere zuur is een keto-oxy-zuur, dat nog niet nader geïdentificeerd is.

3e. Het oorspronkelijke denkbeeld, dat het carbonylzuur een penturonzuur zou zijn, moest opgegeven worden, daar het cinchoninezout van het geoxydeerde product van het carbonylzuur niet identiek bleek te zijn met een der cinchoninezouten van de trioxyglutaarzuren, afgeleid van d-xylose, l-arabinose en d-lyxose.

HOOFDSTUK X.

Bereiding van ascorbinezuur.

§ 1. Bereiding van ascorbinezuur uit sinaasappelen.

Het ascorbinezuur werd door ons in de eerste plaats uit sinaasappelen bereid volgens de methode van A. SZENT-GYÖRGYI. Deze bereiding van het zuur berust op de onoplosbaarheid van het basische loodzout.

Uit het sap werd eerst met bariumacetaat het pectaat verwijderd (het bariumzout van ascorbinezuur is oplosbaar), waarna vervolgens met basisch loodacetaat het ascorbinezuur als een verontreinigd loodzout neergeslagen werd.

De sinaasappelen werden in tweeën gesneden en met een citroenpers uitgeperst. Zoo werden 75 sinaasappelen verwerkt. Hieruit werd 6 l sap verkregen, dat door een neteldoek gefiltreerd werd. Hieraan werd 0.6 cm³ 10%-ige natriumcyanideoplossing toegevoegd, ten einde de gemakkelijk plaats grijpende enzymatische oxydatie tegen te gaan. Het zuur-reageerende sap werd met geconcentreerde ammoniak geneutraliseerd tot pH = 6.2. Na toevoeging van 99 cm³ ammoniak kleurde een druppel der oplossing de universeelindicator geelgroen, hetgeen met pH = 6 overeenkomt. Daarna werd 300 g bariumacetaat, in de vorm van een warme verzadigde oplossing, toegevoegd. Er werd een dik, wit precipitaat van bariumpectaat gevormd. De vloeistof met het precipitaat werd in geheel gevulde gesloten flesschen in de ijskast geplaatst en de volgende dag door dik filtreerpapier gefiltreerd.

Het volume der oplossing bedroeg nu ruim 5 l. Deze oplossing werd in vacuüm bij 35° C. tot 1 l ingedampt. Hieraan werd 0.1 cm³ 10%-ige natriumcyanide-oplossing en 100 g loodacetaat, als een warme verzadigde oplossing, toegevoegd, waarna de vloeistof in een afgesloten flesch gedurende 1 nacht in de ijskast geplaatst werd.

Uit deze oplossing werd vervolgens het ascorbinezuur neergeslagen door toevoeging van ammoniak tot de vloeistof de indicator broomthymolblauw kleurde.

Het afgefiltreerde en met weinig water uitgewasschen neerslag werd in weinig water gesuspenderd en met iets ondermaat zwavelzuur ontleed. Nadat het loodsulfaat afgefiltreerd was, werd bij het filtraat ammoniak gevoegd, tot de pH der oplossing 6 bedroeg.

Aan de vloeistof werd nu driemaal het volume aan 96%-ige alcohol toegevoegd. Nadat het weinige precipitaat, dat gevormd was, afgefiltreerd was, werd aan het filtraat loodacetaat, als warm verzadigde oplossing, toegevoegd. Nadat de oplossing één nacht in de ijskast gestaan had, werd het gevormde neerslag afgefiltreerd en achtereenvolgens met 96%-ige alcohol, absolute alcohol en droge aether gewasschen. Daarna werd het loodzout in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd.

Het loodzout van ascorbinezuur was lichtgeel gekleurd en reduceerde FEHLING'S proefvocht en zilvernitraat bij kamertemperatuur.

Op overeenkomstige wijze werden nog 200 sinaasappelen verwerkt, waaruit 7 g loodzout gewonnen werden.

Uit dit loodzout werd het ascorbinezuur verkregen door het in aceton te suspenderen en met zwavelwaterstof te ontleden. Het zuur werd als een stroop verkregen.

Het gedroogde loodzout werd in een mortier fijn gewreven en in 150 cm³ aceton gesuspenderd. Deze aceton was met calciumchloride gedroogd en vervolgens overgedestilleerd.

Door deze acetonische oplossing werd, door calciumchloride gedroogde, zwavelwaterstof geleid, tot alle loodzout ontleed was. Na filtreren werd in vacuüm bij lage temperatuur ingedampt. Aan de oplossing werd een gelijk volume gedroogde aether en overmaat petroleumaether (kpt.: 40—60° C.) toegevoegd, waarna het ascorbinezuur als een olie neersloeg.

Na afgieten der bovenste vloeistof, werd de olie in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd (in de vacuümexsiccator was bovendien een schaalte natriumhydroxyde geplaatst, om het eventueel in de olie aanwezige azijnzuur te binden). Deze gedroogde stroop werd met watervrije, gedestilleerde aceton uitgetrokken, waarna de extractievloeistof in vacuüm werd ingedampt.

Het residu werd in 25 cm³ methylalcohol, waaraan 15 cm³ watervrije aether toegevoegd werd, opgelost. Hieraan werd een overmaat petroleumaether toegevoegd, waarna het mengsel in de ijskast geplaatst werd. Het ascorbinezuur sloeg hierbij echter als een olie neer en kristalliseerde niet uit.

§ 2. Bereiding van ascorbinezuur uit paprika's.

SZENT-GYÖRGYI (247) had, zooals reeds in hoofdstuk IV is medegedeeld, opgemerkt, dat bepaalde soorten van de uit Hongarije afkomstige paprika's (*Capsicum annuum*) een hoog gehalte aan ascorbinezuur hebben en dat dit zuur op relatief eenvoudige wijze uit deze vruchten geïsoleerd kan worden.

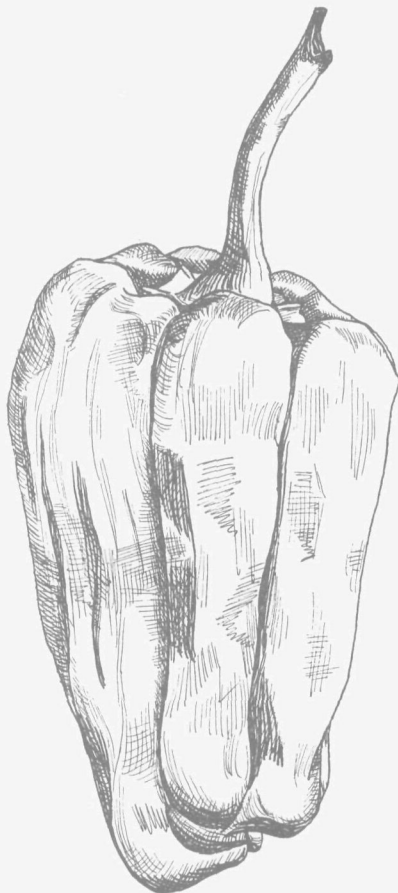
Wij hebben ook deze methode van SZENT-GYÖRGYI toegepast. De door ons verwerkte paprika's (zie figuur I) waren uit Roemenië afkomstig; de vruchten werden op ons verzoek door Ir. H. H. Buss verzonden. Aangezien de paprika's zoo snel mogelijk, na het plukken, verwerkt moeten worden, werden zij per vliegmaschine van Roemenië naar Holland vervoerd, zoodat de vruchten 2¹/₂ à 3 dagen na het plukken verwerkt konden worden.

Wij hebben 2 soorten paprika's verwerkt en wel een roode en een groene varieteit. Er waren ongeveer 16 kg roode paprika's en ongeveer 8 kg groene paprika's beschikbaar. Deze twee soorten hebben wij afzonderlijk verwerkt.

Uit het sap van deze paprika's werd het ascorbinezuur als loodzout afgescheiden.

16 kg roode paprika's, waaruit de kernen verwijderd waren, werden in een vleeschmolen fijn gemalen. Aan deze brij werden 650 g, in weinig warm water opgelost, bariumacetaat toegevoegd. Na 1 uur gestaan te hebben, werd de brij in een pers uitgeperst. Zoo werden \pm 12 l roodgekleurd sap verkregen. Deze roode kleur is te wijten aan

FIGUUR I.



Afbeelding van een paprika uit Roemenië (op ware grootte).

een, in de vloeistof gesuspendeerd, rood gekleurd, fijn neerslag, dat moeilijk af te filtreren is. Aan deze oplossing werden 180 g loodacetaat toegevoegd. Het gevormde neerslag werd afgefiltreerd.

Bij toevoeging van ammoniak aan het filtraat, tot de indicator broomthymolblauw gekleurd werd, sloeg het ruwe loodzout van ascorbinezuur als een lichtgekleurd, amorf precipitaat neer.

Het loodzout werd afgefiltreerd, in weinig water gesuspenderd en met 25%-ig zwavelzuur (tot de indicator thymolblauw rood gekleurd werd) ontleed.

Nadat het gevormde loodsulfaat afgefiltreerd was, werd een kleine overmaat bariumacetaat aan het filtraat toegevoegd. Het gevormde bariumsulfaat werd afgefiltreerd.

Vervolgens werd uit de oplossing het ascorbinezuur weer met loodacetaat en ammoniak geprecipiteerd. Het afgefilterde loodzout werd in vacuüm boven geconcentreerd zwavelzuur gedroogd.

Op analoge wijze werd ook loodascorbinaat uit de groen gekleurde paprika's bereid.

De verdere verwerking tot het ascorbinezuur werd in de eerste plaats volgens de laatste methode van SZENT-GYÖRGYI (247) uitgevoerd.

Het loodzout (van de groene variëteit paprika's) werd in weinig water gesuspenderd en met een kleine overmaat 25%-ig zwavelzuur ontleed. Nadat het gevormde neerslag afgefiltreerd was, werd de overmaat zwavelzuur geneutraliseerd met ammoniak.

De vloeistof werd in vacuüm (bij 25° C.) ingedampt tot een klein volume. Aan deze vloeistof werd tweemaal het volume aan methylalcohol toegevoegd.

Nadat het gevormde neerslag afgefiltreerd was, werd aan het filtraat een gelijk volume aceton toegevoegd. Het hierbij gevormde neerslag werd met methylalcohol behandeld en vervolgens werd aan dit methylalcohol-extract een gelijk volume aceton toegevoegd.

De beide methylalcohol-aceton-filtraten werden in vacuüm tot een klein volume ingedampt. Aan deze vloeistof werden 1 volume methylalcohol en 5 volumina aceton toegevoegd.

Aan de gefiltreerde oplossing werd vervolgens een gelijk volume aether toegevoegd. Het filtraat werd in vacuüm ingedampt, doch het ascorbinezuur kristalliseerde niet uit. Daarom werd getracht om het *mono-acetonderivaat* af te scheiden. Daartoe werd de ascorbinezuurstroop in gedroogde aceton opgelost en met watervrij kopersulfaat gedurende 24 uren in een volle gesloten flesch geschud.

Aan het filtraat werd vervolgens tweemaal het volume aan petroleumaether toegevoegd. Het acetonderivaat kristalliseerde echter niet uit.

Zeer waarschijnlijk was het ascorbinezuur bij de bereiding van het loodascorbinaat en bij de verdere verwerking daarvan, door de luchtzuurstof gedeeltelijk geoxydeerd tot het dehydro-ascorbinezuur (hoofdstuk IV), waardoor de kristallisatie gehinderd werd.

Wij hebben het overblijvende loodzout dan ook op een andere wijze verwerkt, n.l. op ongeveer dezelfde wijze als bij de ascorbinezuurbereiding uit sinaasappelsap is beschreven.

Het gedroogde loodzout hebben wij in gedroogde aceton gesuspenderd. Vervolgens hebben wij gedroogd zwavelwaterstof door deze acetonsuspensie geleid.

Het eventueel bij de loodzoutbereiding gevormde dehydro-ascorbinezuur wordt in dit geval tot het ascorbinezuur gereduceerd.

Het filtraat hebben wij vervolgens bij kamertemperatuur in

vacuüm ingedampt. Het residu werd daarna met methylalcohol uitgetrokken. Aan dit extract werd overmaat aceton toegevoegd. Bij indampen van het filtraat in vacuüm kristalliseerde het ascorbinezuur uit (zie microfotografie V). Opbrengst: ± 1 g.



MICROFOTOGRAFIE V.

Kristallen van ascorbinezuur in gepolariseerd licht (vergrooting: $62\times$).

Deze opbrengst is veel kleiner dan SZENT-GYÖRGYI opgeeft, hetgeen intusschen niet behoef te verwonderen.

In de eerste plaats toch gebruikt deze onderzoeker volkomen verse paprika's, terwijl de door ons gebruikte vruchten door de reis veel geleden hadden.

In de tweede plaats wordt bij de, door ons toegepaste, laatste methode het ascorbinezuur en het loodascorbinaat gemakkelijk door loodsulfide omhuld, waardoor de opbrengst aan ascorbinezuur kleiner wordt.

Samenvatting.

1e. Uit sinaasappelsap werd volgens de methode van SZENT-

GYÖRGYI het loodzout van ascorbinezuur bereid. Het ascorbinezuur zelf werd hierbij niet kristallijn verkregen.

2e. Uit paprika's (uit Roemenië afkomstig) werd volgens de methode van SZENT-GYÖRGYI het ascorbinezuur als loodzout afgescheiden.

Uit dit loodzout kon het ascorbinezuur met een klein rendement kristallijn verkregen worden.

HOOFDSTUK XI.

Onderzoek naar de aard der polymannuronzuren A en B.

§ 1. Aard van de zuurcomponenten der polymannuronzuren A en B.

Sommige onderzoekers (38, 170) achten het mogelijk, dat er naast het mannuronzuur nog andere zuren als componenten van de polymannuronzuren voorkomen. Deze onderstelling vindt steun in het feit, dat in de literatuur het smeltpunt van het cinchoninezout van de hydrolyseproducten van polymannuronzuur varieert van 152° C. tot 204° C. (zie tabel V).

Ten einde na te gaan, of het polymannuronzuur uit meer dan één zuur opgebouwd is, werden de cinchoninezouten der hydrolyseproducten der polymannuronzuren nader onderzocht.

Allereerst werd het smeltpunt van het cinchoninezout van zuiver mannuronzuur bepaald. Hiertoe werd uit gekristalliseerd mannuronzuurlacton het bariumzout en daaruit, volgens de hierna beschreven methode, het cinchoninezout van mannuronzuur bereid. Bij 154° C. verkleurde de witkristallijne stof iets; zij smolt bij 158° C.

Vervolgens werden de cinchoninezouten der, bij hydrolyse der polymannuronzuren A en B met 1,25%-ig en met 2,5%-ig zwavelzuur verkregen, zuren bereid. Deze cinchoninezouten werden door gefractioneerde kristallisatie in fracties gescheiden en van de diverse fracties werden de smeltpunten bepaald.

De cinchoninezouten werden alle op de volgende wijze bereid:

Het bariumzout van het hydrolyseproduct van het polyzuur werd in water opgelost en de oplossing werd tot koken verhit. Hieraan werd iets ondermaat, in een mortier fijn-gewreven, cinchoninesulfaat toegevoegd. Na 1 minuut koken werd afgefiltreerd en de oplossing met noriet ontleurd. Het filtraat werd nu in een kristalliseerschaaltje in vacuüm boven geconcentreerd zwavelzuur geplaatst. Bij het indampen der oplossing kristalliseerde het cinchoninezout uit.

De omkristallisatie geschiedde uit warm water.

Zooals wij uit tabel V kunnen zien, heeft het, door hydrolyse van polymannuronzuur A met 2,5%-ig zwavelzuur verkregen zuur,

TABEL V.

Smeltproeven met cinchoninezouten van hydrolyseproducten der polymannuronzuren						
Fracties der gefractioneerde kristallisatie der cinchoninezouten	Fracties van een hernieuwde omkristallisatie	Verkleuring: a Zwart worden: b Smelten: c	Temperaturen van verkleuren, zwart worden en smelten der hydrolyseproducten der polymannuronzuren in ° C.			
			A(2.5)	B(2.5)	(A+B)(1.25)	B(1.25)
Fractie I ↙ ↘		a	158	156	150	154
		b	—	—	—	161
		c	159	159	158—170	170
	Fractie Ia	a			154	
		b			160	
		c			164—170	
Fractie Ib	a			154		
	b			161		
	c			166—168		
Fractie II ↙ ↘		a	158	156	150	
		b	—	—	180	
		c	159	159	190—193	160—170
	Fractie IIa	a			154	
		b			165	
		c			180—183	
Fractie IIb	a			162		
	b			180		
	c			190—193		

Toelichting bij de tabel. A (2,5) beteekent: het zuur, verkregen door polymannuronzuur A, volgens de laatst beschreven methode, met 2,5%-ig zwavelzuur te hydrolyseeren.

(A + B) (1,25) beteekent: het zuur, of de zuren, verkregen door een mengsel der polymannuronzuur A en B, volgens de laatst beschreven methode, met 1,25%-ig zwavelzuur te hydrolyseeren.

hetzelfde smeltpunt als het onder analoge omstandigheden uit polymannuronzuur B verkregen zuur. Verder blijken de twee eerst-verkregen fracties van de, door hydrolyse der polymannuronzuren verkregen, zuren dezelfde smeltpunten te bezitten. De conclusies, die uit deze feiten getrokken mogen worden, zijn:

1e. De polymannuronzuren zijn ieder uit slechts één zuur opgebouwd.

2e. De polymannuronzuren A en B zijn uit dezelfde zuurcomponent opgebouwd.

Verder blijkt uit de tabel, dat in het hydrolysaat der polyzuren, die met 1,25%-ig zwavelzuur gehydrolyseerd zijn, producten aanwezig zijn, waarvan de smeltpunten der cinchoninezouten hooger liggen dan die van het cinchoninezout van het zuur, dat door hydrolyse met 2,5%-ig zwavelzuur werd verkregen. Dit is zeer waarschijnlijk te wijten aan onvoldoende hydrolyse met 1,25%-ig zwavelzuur, dus aan de aanwezigheid van gedeeltelijk afgebroken, in water oplosbare, polymannuronzuren.

Men zou nu echter ook kunnen denken, dat de hogere smeltpunten, die na de hydrolyse met 1,25%-ig zwavelzuur werden gevonden, aan de aanwezigheid van producten, die bij de hydrolyse der polymannuronzuren steeds naast het mannuronzuur ontstaan, b.v. aan de aanwezigheid van het pentanon-4-al-5-zuur, te wijten waren.

Die verklaring is echter te verwerpen, daar:

1e. het pentanon-4-al-5-zuur zeer moeilijk een gekristalliseerd cinchoninezout geeft; 2e. in dit geval de cinchoninezouten van de hydrolyseproducten der met 2,5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerde polymannuronzuren de grootste verschillen in de smeltpunten der verschillende fracties zouden moeten vertoonen, aangezien men bij de hydrolyse met 2,5%-ig zwavelzuur meer ontledingsproducten heeft te verwachten dan bij de hydrolyse met 1,25%-ig zwavelzuur. De fracties van de cinchoninezouten van de hydrolyseproducten der met 2,5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerde polymannuronzuren bleken echter gelijk smeltpunt te bezitten.

Deze resultaten verklaren ook de verschillende smeltpunten, die de diverse onderzoekers voor het cinchoninezout van het hydrolyseproduct van polymannuronzuur gevonden hebben, welke smeltpunten in de onderstaande tabel zijn samengevat.

TABEL VI.

Opgaven uit de literatuur omtrent smeltpunten van cinchoninezouten van de hydrolyseproducten der polymannuronzuren	
Onderzoekers	Smpt. cinchoninezout van hydrolyseproduct van mengsel der polymannuronzuren A en B
E. Schmidt en F. Vocke	204° C.
W. L. Nelson en L. H. Cretcher	152° C.
G. M. Bird en P. Haas	161° C. (195° C.)
T. Miwa	175° C. (212° C.)

De getallen tusschen haakjes geven de smeltpunten van de partieel gehydrolyseerde polymannuronzuren weer.

Samenvatting.

1e. Zoowel het polymannuronzuur A als het polymannuronzuur B zijn uit slechts één zuurcomponent opgebouwd.

2e. De verschillen in smeltpunten, die men in de literatuur voor het cinchoninezout van het zuur, verkregen bij hydrolyse der polymannuronzuren, aantreft, zijn aan onvoldoende hydrolyse der polymannuronzuren te wijten.

3e. Volgens de, op pag. 73 beschreven, methode met 2,5%-ig zwavelzuur bereid bariummannuronaat bevat geen, in water oplosbare, bariumzouten van polymannuronzuren meer; met 1,25%-ig zwavelzuur bereid bariummannuronaat bevat daarentegen in water oplosbare bariumzouten van polymannuronzuren.

§ 2. Methyleering der polymannuronzuren A en B.

Ten einde iets naders over de constitutie der polymannuronzuren te weten te komen, werd een methode uitgewerkt om deze zuren te methyleeren.

Voor de methyleering der polymannuronzuren werd eerst de methode van H. URBAN (260), zooals hij deze voor de methyleering van lignine toegepast had, gebezigd. Bij de methyleering van lignine wordt dimethylsulfaat bij een temperatuur van 25° C. gedruppeld in een suspensie van lignine in 45%-ige kaliloog. Deze methode werd op het polymannuronzuur B met een kleine wijziging toegepast. In

plaats van 45%-ige kaliloog werd namelijk 30%-ige kaliloog gebruikt.

In 10 g polymannuronzuur B, die in 600 cm³ 30%-ige kaliloog opgelost waren, werden, onder goed roeren, bij $\pm 10^\circ \text{C}$. in 2 uren tijd 75 cm³ ontzuurd dimethylsulfaat druppelsgewijze toegevoegd.

Met overmaat alcohol werd het kaliumzout uit de oplossing geprecipiteerd. Het afgefiltreerde neerslag werd in water opgelost, waarna overmaat zoutzuur aan deze oplossing werd toegevoegd. Het gevormde precipitaat werd afgefiltreerd en goed met gedestilleerd water en vervolgens met alcohol uitgewassen.

In het gedroogde zout werd door titratie het equivalentgewicht en door een methoxylbepaling volgens ZEISEL het methoxylgehalte bepaald. De stof bleek een equivalentgewicht van 185 te hebben en 3,59% OCH₃ te bevatten.

Indien, zoals wij mochten verwachten (zie pag. 102), het polymannuronzuur B 2 hydroxylgroepen bevatte, moest bij volledige methyleering het equivalentgewicht 204 en het methoxylgehalte 30,4% bedragen.

Vervolgens werd het polymannuronzuur B volgens dezelfde methode in geconcentreerde kaliloog gemethyleerd.

De uitvoering der proef was geheel analoog aan de voorgaande, alleen was de loogconcentratie tot 45% verhoogd. Van het verkregen gemethyleerde product werd een methoxylbepaling uitgevoerd. Methoxylgehalte: 4,06%.

Deze laatste proef werd ook met polymannuronzuur A uitgevoerd. Het verkregen product bevatte 3,4% methoxyl.

Deze methode geeft dus zeer onbevredigende resultaten. Slechts een gering gedeelte van het polymannuronzuur werd gemethyleerd. Klaarblijkelijk wordt het grootste gedeelte van het dimethylsulfaat door de geconcentreerde loog in dimethylaether omgezet.

Vervolgens werd een methode toegepast, waarbij dit bezwaar vermeden werd, n.l.: gelijktijdige toevoeging van dimethylsulfaat en loog bij 55° C. Deze methode werd door W. N. HAWORTH (93) voor de methyleering van cellulose gebezigd. In de eerste plaats werd het polymannuronzuur B volgens deze methode gemethyleerd. Hierbij bleek bij de eerste methyleering een, in water en in alcohol oplosbaar, product te ontstaan. Het product werd geïsoleerd door, na de methyleering, met alcohol de natriumzouten van gemethyleerd en gedeeltelijk niet-gemethyleerd polymannuronzuur B te precipiteren. Dit mengsel werd vervolgens gescheiden door het in water

op te lossen en met zoutzuur aan te zuren. Het filtraat bevatte nu het gemethyleerde polymannuronzuur B, dat, na neutralisatie met natronloog, met alcohol als natriumzout afgescheiden werd.

8 g polymannuronzuur B werden in water tot zwellung gebracht, waarna het polyzuur in een kleine overmaat kaliloog opgelost werd (het volume is dan 100 cm³). Deze oplossing werd in een rondkolfje met brede hals in een waterbad op constante temperatuur (55° C.) gehouden. Met een mechanische roerder werd de oplossing goed geroerd.

Uit druppelrechten werden vervolgens gelijktijdig 10 cm³ ontzuurd dimethylsulfaat en 26.6 cm³ 30%-ige natronloog in ongeveer 10 minuten tijds bijgedruppeld. Zoo werden 15 × 10 cm³ dimethylsulfaat en 15 × 26.6 cm³ 30%-ige natronloog toegevoegd.

Aan de oplossing werd tweemaal het volume aan alcohol toegevoegd, waarna de vloeistof gedurende een nacht in de ijskast werd geplaatst. Het gevormde neerslag werd afgefilterd. Aan het filtraat werd nogmaals tweemaal het volume aan alcohol toegevoegd en het daarbij gevormde neerslag werd weer afgefilterd. Het gezamenlijke neerslag werd in water opgelost en met zoutzuur aangezuurd. Er werd een weinig neerslag gevormd, dat afgefilterd werd.

Aan het filtraat werd overmaat alcohol toegevoegd. Er ontstond een weinig neerslag, dat, na koken met 20%-ig zoutzuur, FEHLING's proefvocht niet reduceerde, dus geen, al dan niet gemethyleerd, polymannuronzuur was.

Na affiltratie van dit neerslag werd een filtraat verkregen, waarvan een klein deel, na koken met 20%-ig zoutzuur, FEHLING's proefvocht wel reduceerde. Aan het overige deel der oplossing werd een kleine overmaat versch bereide 4-n natronloog toegevoegd. Daar het hierbij gevormde neerslag moeilijk afgefilterd kon worden, werd de suspensie in een geheel daarmede gevulde flesch gedurende een nacht in de ijskast geplaatst, ten einde het neerslag te laten bezinken. De volgende dag werd de bovenstaande heldere vloeistof afgeschonken en het neerslag met 96%-ige alcohol uitgewassen. Opbrengst: 6 g. Dit natriumzout werd in vacuüm boven schaaltes calciumoxyde en fosforpentoxyde gedroogd.

Van dit éénmaal gemethyleerde product werd een methoxylbepaling volgens ZEISEL verricht. De stof bevatte 19,1% methoxyl. In de onderstelling, dat polymannuronzuur 2 hydroxylgroepen per 6 koolstofatomen bevat, zou het natriumzout van het volledig gemethyleerde zuur 27,4% methoxyl bevatten.

Het in water opgelost natriumzout werd niet geprecipiteerd door Ag⁺, Ba⁺⁺, Hg⁺⁺ of Cu⁺⁺, wel echter door basisch loodacetaat.

Dit éénmaal gemethyleerde polymannuronzuur B werd vervolgens nogmaals gemethyleerd volgens dezelfde methode.

Daarbij werd een, in water en in alcohol oplosbaar, product verkregen, waarvan het natriumzout een methoxylgehalte van 20,2% had.

5.5 g éénmaal gemethyleerd natriumzout van polymannuronzuur B werden in water opgelost en op de hierboven beschreven wijze gemethyleerd met 5 × 10 cm³ dimethylsulfaat en 5 × 26.6 cm³ 30%-ige natronloog. Aan de oplossing werd daarna weer overmaat alcohol toegevoegd en het gevormde neerslag werd afgefilterd. Vervolgens werd het neerslag in water opgelost en met zoutzuur aangezuurd.

Hierbij werd een neerslag gevormd, dat, na koken met 20%-ig zoutzuur, Fehling's proefvocht reduceerde. Dit neerslag werd hier verder niet onderzocht, doch wel in het geval van polymannuronzuur A (zie hieronder).

Aan het, van het neerslag afgefilterde, filtraat werd overmaat alcohol en een kleine overmaat natronloog toegevoegd. Het geprecipiteerde natriumzout van polymannuronzuur B werd afgefilterd en, bevatte, volgens een methoxybepaling naar ZEISEL, 20,2% methoxyl.

Het polymannuronzuur A werd op analoge wijze gemethyleerd als het polymannuronzuur B. Het eenmaal gemethyleerde polymannuronzuur A was oplosbaar in water en alcohol. Het natriumzout van dit gemethyleerde zuur bevatte 18,2% methoxyl.

Hoewel het éénmaal gemethyleerde polymannuronzuur A volledig in water oplosbaar was, werd er bij de tweede methyleering, evenals dat bij polymannuronzuur B het geval was, een fractie afgescheiden, die onoplosbaar in water was.

Aan 3,5 g éénmaal gemethyleerd natriumzout van polymannuronzuur A werden bij 55° C. 2×10 cm³ dimethylsulfaat en 2×26.6 cm³ 30%-ige natronloog toegevoegd. Aan de oplossing werd $5 \times$ haar volume aan 96%-ige alcohol toegevoegd. Het afgefilterde neerslag werd in water opgelost en met zoutzuur aangezuurd. Er ontstond een neerslag, dat afgefilterd en in vacuüm boven fosforpentoxyde gedroogd werd.

Een weinig van dit zuur reduceerde, na koken met 20%-ig zoutzuur, FEHLING's proefvocht. De analyses van dit zout gaven de volgende resultaten:

a. Het, door neutralisatie met loog gevonden, aequivalentgewicht bedroeg 217.

b. Het methoxygehalte volgens ZEISEL bedroeg 27,1%.

Het, van het neerslag afgefilterde, filtraat werd in vacuüm ingedampt tot een klein volume. Aan deze oplossing werd overmaat absolute alcohol toegevoegd en daarna werd de vloeistof in de ijskast geplaast. De volgende dag was er een kristallijn neerslag gevormd, dat met bariumchloride geen neerslag gaf. Er werd wel een neerslag met bariumchloride gevormd, indien de stof eerst met 50%-ige kalilooog gekookt en daarna met zoutzuur aangezuurd werd. Het kristallijne neerslag bestond dus zeer waarschijnlijk uit het natriumzout van monomethylzwavelzuur.

Uit het, van de kristallijne massa afgefilterde, alcoholische filtraat werd vervolgens door toevoeging van een kleine overmaat natronloog het natriumzout van gemethyleerd polymannuronzuur A afgescheiden. Het methoxygehalte van dit natriumzout bedroeg 20,2%.

Het eigenaardige gedrag der polyzuren bij de methyleering zou verklaard kunnen worden door aan te nemen, dat het polymannuronzuur bij de methyleering ontleed werd.

Dit is echter niet waarschijnlijk, daar het dimethylsulfaat en de loog gelijktijdig in de polymannuronaatoplossing gedruppeld werden en de oplossing noch sterk alkalisch, noch sterk zuur werd.

Samenvatting.

De polymannuronzuren A en B vertoonden beide bij methyleering

hetzelfde gedrag. Bij de eerste methyleering werd een product verkregen, waarvan het natriumzout een methoxylgehalte van 19,1% en 18,2% (resp. voor natriumzout van gemethyleerd polymannuronzuur B en A) had. De éénmaal gemethyleerde polymannuronzuren A en B waren oplosbaar in water en alcohol. De natriumzouten waren onoplosbaar in alcohol.

Bij de tweede methyleering werden 2 fracties geïsoleerd. De eene fractie was onoplosbaar in water en had een methoxylgehalte van 27,1%. Deze fractie bestond uit, voor 89,5% gemethyleerd, polymannuronzuur. De andere fractie was oplosbaar in water en alcohol. De natriumzouten waren onoplosbaar in alcohol en hadden een methoxylgehalte van 20,2%. Deze tweede fractie bestond dus uit, voor 74% gemethyleerd, polymannuronzuur. Voegden wij bij een geconcentreerde oplossing van deze natriumzouten zoutzuur, dan sloeg weer een gedeelte vrij zuur neer.

Kort samengevat blijkt dus, dat de, in water onoplosbare, polymannuronzuren bij gedeeltelijke methyleering oplosbaar worden, doch bij verdere methyleering weer onoplosbaar in water worden.

§ 3. Constitutie van de polymannuronzuren A en B.

Bij de hydrolyse geven zowel het polymannuronzuur A als polymannuronzuur B vrijwel uitsluitend mannuronzuur. De in de polyzuren A en B resp. gevonden mannose en fucose, konden wij, zooals wij later zullen zien, slechts in zeer kleine hoeveelheden aantoonen, zoodat wij daarmee bij het opstellen van een constitutieformule geen rekening behoeven te houden. Dit zelfde geldt voor het, in de asch der polymannuronzuren gevonden, fosforzuur.

Dat de genoemde stoffen slechts in zeer kleine hoeveelheden in de polymannuronzuren aanwezig zijn, blijkt eveneens uit het aequivalentgewicht, dat wij bij neutralisatie van de polymannuronzuren met loog vinden. Dat varieert van 176 tot 185, terwijl een zuiver polymannuronzuur een aequivalentgewicht van 176 heeft.

De polymannuronzuren reduceeren FEHLING's proefvocht praktisch niet, hetgeen er op wijst, dat de aldehydegroepen beschermd zijn. Dit is te verklaren, door een glucosiedbinding tusschen mannuronzuurmoleculen aan te nemen.

Voor de bouw bestaan twee mogelijkheden:

a. Het polymannuronzuur bestaat uit een lange keten van

mannuronzuurmoleculen. Alleen de uiterste aldehydegroep is dan vrij. Hoe langer de keten is, hoe kleiner het reductievermogen van een bepaalde gewichtshoeveelheid van het polyzuur zal zijn.

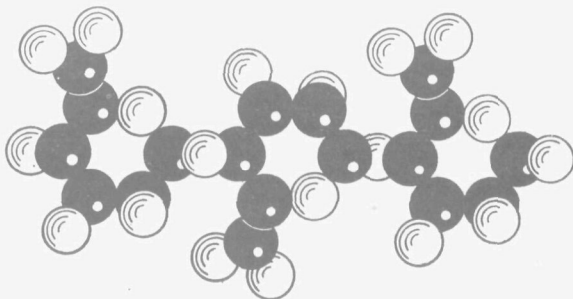
b. Het polymannuronzuur bestaat uit kleine gesloten ketens van mannuronzuurmoleculen. Deze laatste opvatting wordt, zooals reeds in hoofdstuk II is opgemerkt, door F. EHRlich en medewerkers voor de structuur van het polygalacturonzuur in de pectine verdedigd. Deze opvatting van EHRlich vindt felle bestrijding. K. H. MEYER en H. MARK (158) zijn van oordeel, dat bij het polygalacturonzuur lange ketens aangenomen moeten worden.

Welke van de beide opvattingen voor de structuur der polymannuronzuren ook juist moge zijn, het moet daarbij mogelijk zijn om twee hydroxylgroepen per 6 koolstofatomen aan te toonen. De methoxylgehalten van de gemethyleerde polymannuronzuren hebben nu inderdaad de aanwezigheid van 2 hydroxylgroepen per zes koolstofatomen waarschijnlijk gemaakt.

Onze proefnemingen geven echter geen antwoord op de vraag, of wij in deze polyzuren met een amyleenoxyde-ring (furanosestructuur), of met een methyleenoxyyde-ring (pyranosestructuur) te maken hebben.

Daarvoor zou het noodig zijn, de gemethyleerde polymannuronzuren te hydrolyseeren en de constitutie der hydrolyseproducten te onderzoeken.

Wij zijn nu verder van meening, dat lange ketens van mannuronzuurmoleculen aangenomen moeten worden. Voor deze opvatting pleit: de onoplosbaarheid en de gemakkelijke gelvorming der polymannuronzuren.



FIGUUR II.

Atoommodel van polymannuronzuur.

Dat de polymannuronzuren uit lange ketens zijn opgebouwd, is ook in overeenstemming met de onderstelling (zie hoofdstuk XII), dat de poly-uronzuren door oxydatie uit de overeenkomstige hexanen ontstaan. J. PATTERSON (194) neemt namelijk voor het mannaan lange ketens aan.

De polymannuronzuren A en B gelijken zeer op elkaar. Zij verschillen in hoofdzaak in de oplosbaarheid, de gelvorming en de blauwkleuring met een jood-joodkaliumoplossing en zwavelzuur. Na eenige tijd koken met een verdund mineraalzuur verliest echter het polymannuronzuur B de eigenschap zich met jood-joodkali en zwavelzuur blauw te kleuren en is ook het vermogen tot gelvorming geringer geworden.

Uit de proeven valt niet te concluderen, of het verschil tusschen de polyzuren A en B uitsluitend in een verschil van lengte der ketens bestaat. De reductie van FEHLING's proefvocht geeft hierover geen uitsluitsel.

In verband hiermede hebben wij aan de polymannuronzuren A en B voorloopig dezelfde constitutiefomule gegeven (zie figuur II).

De in de literatuur gebezigde aanduiding voor deze beide verbindingen is, zooals wij reeds vermeldden, „alginezuur” en „fucinezuur”, resp. voor de zich niet en voor de zich wel met jood-joodkali kleurende stof. Aangezien deze beide zuren, blijkens het voorafgaande, volkomen op elkaar gelijken, en uit dezelfde component opgebouwd zijn, hebben wij het alginezuur als polymannuronzuur A en het fucinezuur als polymannuronzuur B aangeduid. Bij de bereiding der beide zuren uit zee-algen is namelijk de volgorde van isoleering: polymannuronzuur A en daarna polymannuronzuur B. Ook in het vervolg zijn deze benamingen gebruikt.

§ 4. Het aantoonen van kleine hoeveelheden mannose in polymannuronzuur A en van kleine hoeveelheden fucose in polymannuronzuur B.

Voor het onderzoek der vraag, of de polymannuronzuren ook nog kleine hoeveelheden andere suikers bevatten, hebben wij de polymannuronzuren gehydrolyseerd en de hydrolyseproducten onderzocht. Hierbij kon onder de hydrolyseproducten van polymannuronzuur A mannose en onder de hydrolyseproducten van polymannuronzuur B fucose worden aangetoond. De uitvoering van het onderzoek van het polymannuronzuur A was als volgt:

50 g polymannuronzuur A werden met 2.5 l 2.5%-ig zwavelzuur gedurende 18 uren (in 2 étappes) in een rondkolf met terugvloeikoeler op een zandbad gekookt. Na neutralisatie, filtratie en ontkleuring met noriet, werd de oplossing in vacuüm bij 35° C. ingedampt. Het bariummannuronaat werd met overmaat alcohol uit de oplossing geprecipiteerd. Het alcoholisch filtraat werd in vacuüm ingedampt, waarna nogmaals overmaat alcohol aan de oplossing werd toegevoegd. Deze alcoholische oplossing, die geen mannuronzuur meer bevatte, werd op de aanwezigheid van suikers onderzocht.

Daartoe werd de alcoholische oplossing ingedampt en aan deze oplossing p-broomphenylhydrazine, dat in weinig alcohol opgelost was, toegevoegd. Na eenige tijd werd een kristallijn precipitaat gevormd, dat uit rozetten van naalden bestond, die tusschen gekruiste nicols oplichtten.

Na omkristallisatie uit 50%-ige alcohol werd een smeltpunt van 195° C. gevonden. Het omgekristalliseerde zout bestond, behalve uit rozetten, ook uit parallelpipeda. Daar het smeltpunt en de eigenschappen van het hydrazon op mannosebroomphenylhydrazon wezen, werd dit laatste, ter vergelijking, bereid uit mannose en p-broomphenylhydrazine. Het verkregen hydrazon bleek eveneens uit naaldenbundels te bestaan. Na omkristallisatie uit 50%-ige alcohol, waren er, behalve rozetten, ook veel ruitvormige kristallen aanwezig. Het smeltpunt was 198° C. Na menging van het eerstgenoemde hydrazon met het, uit mannose bereide, mannose-p-broomphenylhydrazon bleef het smeltpunt 198° C. Het, bij de hydrolyse van polymannuronzuur A, verkregen product is dus *mannose*.

Vervolgens werd het *polymannuronzuur B* op volkomen analoge wijze onderzocht als het polyzuur A. Hierbij werd een p-broomphenylhydrazon verkregen, dat uit dunne naaldjes bestond, die een smeltpunt van 175° C. hadden. De stof was identiek met *fucosebroomphenylhydrazon*.

Het is opmerkelijk, dat wij bij de beide polymannuronzuren niet dezelfde suiker onder de hydrolyseproducten vinden.

Vooraf de aanwezigheid van mannose in polymannuronzuur A is belangwekkend. Mannose werd ook reeds vroeger in sommige zeewierren aangetoond door R. H. F. MANSKE (150). Door ons werd dus nu mannose in *Fucus serratus* naast polymannuronzuur aangetoond. Dit is van belang, daar hiermede weer een voorbeeld van het samengaan in de natuur van de hexosen met de overeenkomstige uronzuren wordt gegeven. Het samengaan van glucose met glucuronzuur en van galactose met galacturonzuur is reeds lang aangetoond. Het samengaan van mannose en mannuronzuur is echter nieuw en steunt de hypothese, dat de uronzuren in de planten door oxydatie uit de, in sterisch opzicht daarmee overeenkomende, hexosen, waarvan de aldehydegroepen zijn beschermd, zouden ontstaan.

Hierbij zij tevens opgemerkt, dat in de zee-algen ook de zeswaardige alcohol *manniet* voorkomt, die eveneens met mannose nauw verwant is.

Uit dit onderzoek is niet gebleken, in welke vorm mannose in het polymannuronzuur A aanwezig is. Het is mogelijk, dat het als mannaan in kleine hoeveelheden vrij naast het polymannuronzuur voorkomt.

Een tweede mogelijkheid is, dat enkele mannosemoleculen gebonden in de keten van mannuronzuurmoleculen voorkomen.

Het voorkomen van kleine hoeveelheden fucose in polymannuronzuur B moet waarschijnlijk als een gevolg van verontreiniging van het polyzuur met fucoïdinezuur opgevat worden.

Samenvatting.

1e. Onder de hydrolyseproducten van het uit de wieren afgescheiden polymannuronzuur A werd een kleine hoeveelheid mannose aangetoond.

2e. Onder de hydrolyseproducten van het uit de wieren afgescheiden polymannuronzuur B werd een kleine hoeveelheid fucose gevonden.

3e. Het naast elkaar voorkomen van mannose, of mannaan, en polymannuronzuur is een nieuw argument voor de opvatting, dat de uronzuren in de planten uit de overeenkomstige hexosen ontstaan.

§ 5. Reductie van polymannuronzuur B.

Wanneer het mogelijk is de carboxylgroep van polymannuronzuur tot een CH_2OH -groep te reduceeren, zou een kunstmatig mannaan verkregen zijn. Dan zou het misschien ook mogelijk blijken te zijn, om het polyglucuronzuur tot cellulose te reduceeren.

Behalve het belang om kunstmatige hexanen te bereiden, zou ook de constitutie der poly-uronzuren door zulk een reductie opgehelderd zijn. Zoals hiervóór reeds is medegedeeld, bestaan over de constitutie nog verschillende opvattingen.

Het is waarschijnlijk, dat bij de reductie der poly-uronzuren de overeenkomstige hexanen zullen ontstaan, daar, zoals in de vorige paragraaf werd medegedeeld, er veel voor pleit, dat de poly-uronzuren in de plant door oxydatie uit hexanen ontstaan.

De proefnemingen zijn door ons uitgevoerd met polymannuronzuur, daar dit, in tegenstelling met het polyglucuronzuur en polygalacturonzuur, als zoodanig nagenoeg zuiver is af te scheiden.

In de allereerste plaats werd getracht, het polymannuronzuur B direct met natriumamalgam te reduceeren.

10 g droog polymannuronzuur B werden in verdunde kaliloog opgelost en de oplossing tot I l aangevuld. Uit deze oplossing werd met verdund zwavelzuur het polymannuronzuur geprecipiteerd. Zoo werd een dikke, gelatineuze massa verkregen, die op een neteldoek werd gebracht om gedurende eenige tijd te kunnen uitdruipen. Onder goed roeren werd aan deze gel 500 g 2%-ig natriumamalgaam in kleine porties toegevoegd. Hierbij werd zorg gedragen, dat de massa juist een weinig zuur bleef met zwavelzuur. Vervolgens werd de gel uitgewassen tot er geen sulfaat meer aan te toonen was. Een gedeelte van de gel werd vervolgens met alcohol uitgewassen en gedroogd, waarna het aequivalentgewicht door neutralisatie met loog werd bepaald. Dit bedroeg ± 186 . Het overige werd met 5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerd, met bariumcarbonaat geneutraliseerd. De oplossing werd gefiltreerd en het filtraat in vacuüm ingedampt. Daarna werd met overmaat alcohol het bariummannuronaat uit de oplossing neergeslagen.

In deze alcoholische oplossing zou dus, indien er reductie van het polymannuronzuur tot mannaan had plaats gegrepen, mannose aanwezig zijn. Zoowel met phenylhydrazine als met p-nitrophenylhydrazine werd op mannose gereageerd, doch de reactie viel negatief uit.

Bij de directe inwerking van natriumamalgaam op polymannuronzuur B had er dus geen reductie plaats gevonden. Dit negatieve resultaat was te verwachten, daar het polymannuronzuur in de gel noch als lacton noch als ester voorkomt en vrije carboxylgroepen niet door natriumamalgaam gereduceerd worden.

Daar het wel mogelijk is, om een ester met natriumamalgaam te reduceeren, werd getracht om het polymannuronzuur te veresteren. Daar er voor de verestering van het zilverzout van polymannuronzuur met alkyljodide geen methyljodide voorhanden was, werd een voorloopige proef uitgevoerd met aethyljodide, waarbij wij dus de aethylester zouden verkrijgen.

Het polymannuronzuur B werd in kaliloog opgelost. Uit deze oplossing werd met zilvernitraat het zilverzout neergeslagen. Het afgefiltreerde, gelatineuze zilverzout werd met 96%-ige alcohol en vervolgens met absolute alcohol watervrij gemaakt. Daarna werd het waterrijke zilverzout van polymannuronzuur met absolute alcohol en aethyljodide gedurende 8 uren in een rondkolfje met terugvloei-coeler op het waterbad gekookt. Het neerslag werd afgefiltreerd.

Het filtraat gaf wel een zwakke naphtoresorcine-reactie, doch na koken met loog en daarna aanzuren met zwavelzuur werd geen neerslag gevormd.

Het hierboven genoemde neerslag werd met water geëxtraheerd. Dit waterige extract gaf weliswaar de naphtoresorcine-reactie, doch bij koken met loog en daarna aanzuren met zwavelzuur werd geen neerslag gevormd.

Het polymannuronzuur zal bij deze proef waarschijnlijk wel veresterd zijn, doch de ester was niet oplosbaar in alcohol of water.

Het neerslag, dat dus vermoedelijk de aethylester van het polymannuronzuur bevatte, was verontreinigd met zilverjodide, zoodat op deze wijze de ester niet in zuivere toestand verkregen werd. Dit

ruwe product kon niet door natriumamalgaam gereduceerd worden, daar de ester door zilverjodide omhuld was.

Vervolgens werd getracht de verestering van het polymannuronzuur met dimethylsulfaat te bereiken. Daar het dimethylsulfaat in tegenwoordigheid van loog ook de hydroxylgroepen methyleert, werd de proef uitgevoerd met het kaliumzout van polymannuronzuur B, zonder toevoeging van loog. Aan de oplossing van dit kaliumzout in water werd de berekende hoeveelheid dimethylsulfaat druppelsgewijze toegevoegd. Ook deze proef gaf echter negatieve resultaten.

10 g polymannuronzuur B werden in kaliloog opgelost. Uit deze oplossing werd het kaliumzout met alcohol geprecipiteerd en gezuiverd door het in water op te lossen en nogmaals met alcohol te precipiteeren. Deze omprecipitatie werd herhaald tot een oplossing van het kaliumzout in water niet alkalisch meer reageerde.

Een oplossing van het kaliumzout in water werd in een rondkolfje gegoten, waarna, onder goed roeren bij 40° C., 4.4 cm³ zuurvrij dimethylsulfaat in de oplossing gedruppeld werden. Na eenige tijd ontstond een gelatineus precipitaat, dat afgefiltreerd en in vacuüm gedroogd werd. Het aequivalentgewicht, door neutralisatie met loog bepaald, bedroeg: ± 180 .

Bij destillatie met kaliloog kon slechts weinig methylalcohol aangetoond worden. Het bij de proef gevormde neerslag bleek zuiver polymannuronzuur te zijn.

Samenvatting.

1e. Het bleek niet mogelijk het polymannuronzuur direct met natriumamalgaam te reduceeren.

2e. Het gelukte niet een ester van polymannuronzuur in zuivere toestand te bereiden.

§ 6. **Het ontstaan van een anhydro-polymannuronzuur.**

Het ontledingsproduct, dat bij koken van polymannuronzuur B met zwavelzuur ontstaat, werd door ons onderzocht. Het was te verwachten, dat er bij deze ontleding een hemicellulose was gevormd.

Zooals wij in het volgende hoofdstuk zullen zien, splitst een uronzuur bij koken met een mineraalzuur koolzuur af en ontstaat daarbij in kleine hoeveelheden de, met het uronzuur overeenstemmende, pentose.

Bij het koken van polymannuronzuur met een mineraalzuur lag het dus voor de hand om aan te nemen, dat daarbij een verbinding zou ontstaan, die uit pentose en uronzuur opgebouwd is. Deze verbinding zou behooren tot de hemicellulosen (en wel tot de polyuroniden).

Het bleek echter, dat bij koken van polymannuronzuur B met verdund zwavelzuur een verbinding ontstond, die, blijkens de titratie met loog, een kleiner aequivalentgewicht had dan het polymannuronzuur B. Dit onverwachte resultaat sloot de aanwezigheid van een hemicellulose uit. In dit laatste geval zouden wij immers een aequivalentgewicht gevonden hebben, dat groter was dan dat van polymannuronzuur B.

Het product was verkregen door 50 g polymannuronzuur B gedurende 12 uren met 2.5 l 2.5%-ig zwavelzuur te koken. De onoplosbare fractie werd afgefiltreerd en zoolang met water uitgewassen, dat er geen zwavelzuur in het waterige extract meer aangetoond kon worden.

Vervolgens werd het precipitaat met 96%-ige alcohol uitgewassen en in vacuüm gedroogd.

Het product bleek *geen blauwkleuring meer met jood-joodkali en zwavelzuur te geven*, in tegenstelling met het polymannuronzuur B. Het product *gaf niet meer in die mate een gel* als het polymannuronzuur B. Verder gaf het product slechts een *zwakke naphtoresorcine-reactie*.

Het gevormde product is een sterker zuur dan azijnzuur, daar het niet in water en wel in een natriumacetaatoplossing oplost.

De titratie werd uitgevoerd door de stof, onder buitensluiting van koolzuur, met overmaat loog gedurende een uur op het waterbad te verhitten en daarna de overmaat loog met zoutzuur terug te titreeren. Het *aequivalentgewicht*, door neutralisatie met loog bepaald, varieerde bij verschillende porties van 155 tot 163 (gemiddeld 160). Van het polymannuronzuur B zelf bedroeg het aequivalentgewichtgemiddelde 180.

Daar het niet aannemelijk is, dat bij het koken van polymannuronzuur B met zwavelzuur nieuwe carboxylgroepen ontstaan, moet dus bij deze ontleding op elke groep van 6 koolstofatomen van het polymannuronzuur een fractie, met een moleculairgewicht van ongeveer 20, afgesplitst zijn.

Het product gaf, bij koken met 12%-ig zoutzuur, een weinig meer furfural dan het polymannuronzuur B. Uit het gemiddelde van 3 furfuralbepalingen bleek, dat 300 mg van het product met 115 mg furfuralphloroglucide overeenkwamen (terwijl 300 mg polymannuronzuur B met 110 mg furfuralphloroglucide overeenkwamen). Deze uitkomst is in overeenstemming met de uitkomst, die wij voor het aequivalentgewicht gevonden hebben.

Het ligt dus voor de hand te onderstellen, dat er op elke 6 koolstofatomen één watermolecuul afgesplitst was.

Aangezien ons deze onderstelling, mede op grond van hetgeen nog volgt, zeer waarschijnlijk voorkomt, hebben wij aan het product de naam van *anhydro-polymannuronzuur* gegeven.

Wellicht zou het juist zijn van anhydro-polymannuronzuur B te spreken. Wij hebben echter niet nagegaan, of ook uit polymannuronzuur A hetzelfde zuur kan worden bereid, maar gezien het nauwe verband tusschen de polyzuren A en B verwachten wij, dat ook uit polyzuur A hetzelfde anhydro-polymannuronzuur zou zijn te verkrijgen.

Deze waterafsplitsing kan op verschillende wijzen plaats grijpen.

In *de eerste plaats* kan een lacton van het polymannuronzuur gevormd zijn. Ten einde deze mogelijkheid te onderzoeken, werd het product getitreerd met loog in de koude. De loog werd druppelsgewijze, onder goed roeren, toegevoegd, tot de indicator phenolphthaleïne rood gekleurd werd. Bij deze uitvoering der titratie zullen wel de vrije carboxylgroepen, doch niet de als lacton aanwezige zuurgroepen getitreerd worden, daar de γ -lactonen vrij stabiele verbindingen zijn. Het is niet waarschijnlijk, dat wij hier met een onstabiel δ -lacton te maken hebben, daar, bij aanvaarden van onze opvatting omtrent de bouw der polymannuronzuren, de hydroxylgroep aan het vierde koolstofatoom (γ -plaats) vrij is.

Uit de titratie bleek, dat minstens 91,5% als vrij zuur aanwezig is. Dit maakt het zeer waarschijnlijk, dat het geheel als vrij zuur aanwezig is, want daar het product onoplosbaar is in water, zullen wij bij de directe titratie te lage uitkomsten krijgen. Dit bleek daaruit, dat bij de titratie niet alle polyzuur oploste.

Het lage equivalentgewicht kan dus niet te wijten zijn aan lactonvorming van het polymannuronzuur. Een bewijs temeer hiervoor is, dat het product slechts een zwakke naphtoresorcine-reactie geeft, hetgeen niet het geval zou zijn bij een lacton van polymannuronzuur. Verder vertoont het kaliumzout van het nieuwe product een andere draaiing dan het kaliumzout van polymannuronzuur B, n.l.: $[\alpha]_D^{23} = -106^\circ$, terwijl het kaliumzout van polymannuronzuur B geeft: $[\alpha]_D^{23} = -114^\circ$. Ook hieruit volgt, dat het verschil tusschen het nieuwe product en het polymannuronzuur van andere aard moet zijn dan die tusschen een lacton en het daarmee overeenkomende zuur.

Een tweede mogelijkheid is, dat van twee alcoholische hydroxylgroepen, onder vorming van een zuurstofbrug, water is afgesplitst. Deze onderstelling is echter onhoudbaar, daar, zooals wij dadelijk zullen zien, het nieuwe product gemakkelijker geoxydeerd wordt dan het polymannuronzuur B.

De derde mogelijkheid is, dat er bij het koken van polymannuronzuur waterafsplitsing heeft plaats gegrepen onder vorming van een dubbele binding. Deze onderstelling is gerechtvaardigd, daar ook bij koken van een uronzuur met 2,5-ig zwavelzuur reeds een aanzienlijke waterafsplitsing onder vorming van furfurol plaats vindt. Voor glucuronzuur en galacturonzuur zijn hieromtrent kwantitatieve proefnemingen verricht (zie hoofdstuk XIII). Ook bij mannuronzuur werd zulk een gemakkelijke furfurolvorming bij koken met verdund zwavelzuur opgemerkt. Bij het koken van polymannuronzuur met verdund zwavelzuur heeft er in de eerste plaats hydrolyse plaats. Doch het ligt voor de hand te onderstellen, dat het zwavelzuur daarnaast op het polymannuronzuur een analoge werking zal uitoefenen, als op het enkelvoudige mannuronzuur, d. w. z., dat het zwavelzuur in de tweede plaats een waterafsplitsing onder vorming van een dubbele binding zal bewerkstelligen.

De eigenschappen van het gevormde product zijn met de onderstelling, dat daarin een dubbele binding voorkomt, in overeenstemming.

Het product *reduceert kaliumpermanganaat* in de koude. Het polymannuronzuur B zelf *reduceert* echter kaliumpermanganaat ook een weinig in de koude.

Belangrijker dan de reductie van kaliumpermanganaat is het *verbruik van broom* bij kamertemperatuur. Een geconcentreerde oplossing van het kaliumzout van het product ontkleurt na eenige minuten broomwater bij kamertemperatuur. Ook het kaliumzout van polymannuronzuur B ontkleurt wel een weinig broomwater, doch daarbij is een veel langere inwerkingsduur noodig.

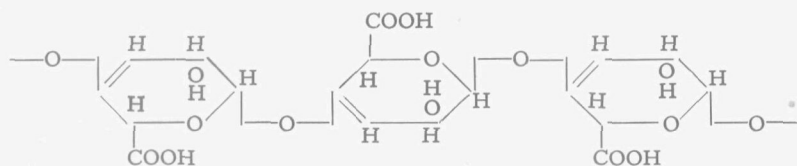
Wat de plaats der dubbele binding betreft, zijn er, wanneer men onze opvatting omtrent de constitutie van het polymannuronzuur aanvaardt, drie mogelijkheden: *a.* tusschen het derde en het vierde C-atoom van de koolstofring; *b.* tusschen het vierde en het vijfde C-atoom; *c.* tusschen het vijfde en het zesde C-atoom.

De tweede dezer mogelijkheden is niet waarschijnlijk, daar in dat geval een keto-enol-verschuiving mogelijk zou zijn. De stof zou in

dit geval ketonreacties moeten vertoonen, hetgeen niet het geval is.

Van de beide andere mogelijkheden is de eerste de waarschijnlijkste. De stand van de H- en OH-groepen in het polymannuronzuur B is zoodanig, dat een waterafplitsing het gemakkelijkst kan plaats grijpen tusschen het derde en vierde koolstofatoom.

De verbinding zou in dit geval de volgende structuurformule hebben:



Formule van anhydro-poly-mannuronzuur.

Ten slotte werd nog getracht de dubbele binding in de stof weer op te heffen.

Daartoe werd de stof gedurende 24 uren met joodwaterstofzuur behandeld. Vervolgens werd het product met kaliloog eenige tijd gekookt en daarna aangezuurd met zwavelzuur. De bij het aanzuren neergeslagen stof gaf een sterkere naphtoresorcine-reactie dan het oorspronkelijke product.

De proef, welke werd uitgevoerd met ongeveer 65%-ig joodwaterstofzuur, heeft slechts betrekkelijke waarde, daar het sterke joodwaterstofzuur allerlei veranderingen in het hierboven genoemde product kan teweeg brengen. Ook is de naphtoresorcine-reactie een te subtiele reactie om uit het verschil in sterkte der kleuring een definitieve conclusie te mogen trekken.

Samenvatting.

Bij het koken van polymannuronzuur met verdund zwavelzuur ontstaat voor een gedeelte een anhydro-poly-mannuronzuur met brutoformule $(C_6H_6O_5)_x$, terwijl er krachtige argumenten voor zijn aan te voeren, dat aan dit zuur de hierboven weergegeven constitutie toekomt.

HOOFDSTUK XII.

Het verband tusschen de, in de natuur voorkomende, uronzuren en poly-uronzuren eenerzijds en de pentosen en pentosanen anderzijds.

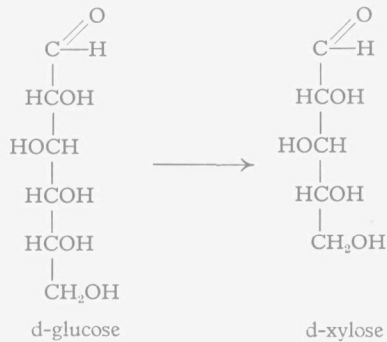
§ 1. Algemeene opmerkingen over het genetisch verband.

Aan het einde van de vorige eeuw hebben verschillende onderzoekers (32, 253a) zich de vraag gesteld, op welke wijze de pentosen en de pentosanen in de plant ontstaan.

Daartoe hebben zij de volgende mogelijkheden nader onder het oog gezien: 1e. de pentosen ontstaan direct bij de koolzuurassimilatie. 2e. zij ontstaan uit de bij de koolzuurassimilatie gevormde hexose.

De eerste hypothese was onhoudbaar, daar er overdag geen opeenhooping van pentosen in het blad plaats vindt.

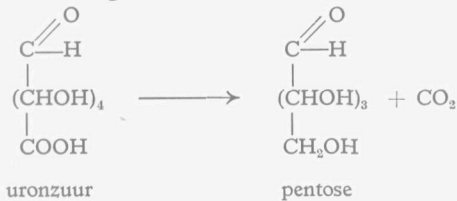
De tweede mogelijkheid bleef dus over. Voor deze hypothese pleitte het veelvuldig naast elkaar in de natuur voorkomen van glucose en xylose, evenals van galactose en arabinose. Van de, bij de koolzuurassimilatie gevormde, hexose zou door afsplitsing van de eindstandige CHOH-groep de, in sterisch opzicht met de hexose overeenstemmende, pentose ontstaan. Zoo stelde men zich de vorming van xylose uit glucose aldus voor:



G. DE CHALMOT (32) nam nu reeds in 1895 aan, dat de bovenstaande afsplitsing over de uronzuren zou verlopen, zoodat de uronzuren

in de plant de brug tusschen de hexosen en de pentosen zouden vormen. Dezelfde opvatting werd in 1904 door C. NEUBERG (176) onafhankelijk van DE CHALMOT verkondigd. Inderdaad hebben latere onderzoekingen deze opvatting waarschijnlijk gemaakt.

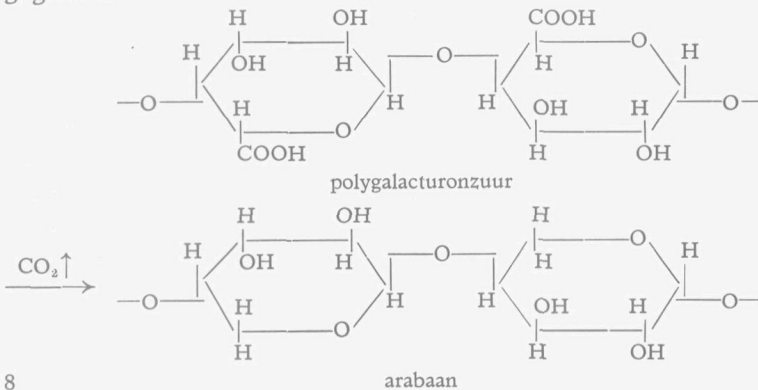
In hoofdstuk XI is reeds uiteengezet, dat het waarschijnlijk is, dat de uronzuren uit de hexosen ontstaan. Het ligt nu voor de hand, dat uit de uronzuren gemakkelijk de, in ruimte-formule daarmee overeenstemmende, pentosen kunnen ontstaan. Immers, het uronzuurmolecuul behoeft slechts één molecuul koolzuur af te splitsen, ten einde in een pentose over te gaan, hetgeen door het volgende schema kan worden voorgesteld:



Deze koolzuurafsplitsing kan men nu inderdaad bewerkstelligen door een uronzuur met een mineraalzuur te verhitten en zij verloopt, onder bepaalde omstandigheden, bijna kwantitatief (133).

De verwantschap tusschen de uronzuren en de pentosen blijkt uit de vele reacties, die zij gemeen hebben. Beide groepen van verbindingen geven o. a. bij koken met minerale zuren furfurol. Beide hebben ook eenige kleurreacties gemeen, b.v. de phloroglucine-reactie en de orcine-reactie.

Geheel analoog kan men zich een verband tusschen poly-uronzuren en pentosanen voorstellen. Bij afsplitsing van 1 molecuul koolzuur van iedere amylenoxyde-ring van een poly-uronzuur ontstaat een pentosaan, hetgeen door het volgende schema wordt weergegeven:



§ 2. Speciale gevallen, wijzende op het genetisch verband tusschen de uronzuren en poly-uronzuren eenerzijds en de pentosen en pentosanen anderzijds.

De in de natuur voorkomende uronzuren zijn galacturonzuur, glucuronzuur en mannuronzuur. De pentosen, die hiermede in sterisch opzicht overeenstemmen, zijn respectievelijk l-arabinose, d-xylose en d-lyxose. Nu komen l-arabinose en d-xylose zeer verbreid in de natuur voor, doch d-lyxose is tot nu toe niet in de plantenwereld aangetroffen.

Behalve de beide genoemde pentosen komt in de natuur nog d-ribose, als bestanddeel van de plantaardige nucleïne-zuren, voor. Het, in ruimteformule met ribose overeenkomende, uronzuur, d-alluronzuur of l-taluronzuur, is tot nu toe onbekend.

In de planten komen nu galacturonzuur en glucuronzuur veelvuldig naast de sterisch daarmee overeenkomende pentosen, n.l. arabinose en xylose, voor. De pectinestoffen bijvoorbeeld zijn een treffend voorbeeld van het voorkomen van galacturonzuur naast arabinose.

Wanneer men de verandering der samenstelling van celwanden bij de verhouting nagaat, blijkt vaak aanvankelijk in deze wanden een hoog pectinegehalte en een laag hemicellulosegehalte te worden aangetroffen. Na de verhouting blijkt daarentegen het pectinegehalte laag en het hemicellulosegehalte (vooral dat aan pentosanen) hoog te zijn geworden. Er wordt dan ook ondersteld (29, 188, 189), dat de pectine, waarvan galacturonzuur de voornaamste bouwsteen is, tijdens het afzetten van houtstof in de celwanden voor een groot gedeelte door decarboxyleering wordt omgezet in arabaan.

F. EHRLICH (52, 54) onderstelt, zooals reeds eerder is opgemerkt, in suikerbieten een soortgelijke omzetting van tetragalacturonzuur in arabaan.

Nog een ander feit pleit voor de onderstelling, dat de arabinose in de natuur uit galacturonzuur ontstaat. Men treft namelijk in de plantenwereld van de beide mogelijke stereo-isomere arabinosen en galacturonzuren bijna uitsluitend l-arabinose en d-galacturonzuur aan. Nu kan uit het d-galacturonzuur bij decarboxyleering slechts l-arabinose en geen d-arabinose ontstaan.

Eenzoo is het naast elkaar voorkomen van d-glucuronzuur en d-xylose in het plantenrijk in overeenstemming met de bovengenoemde hypothese.

§ 3. Vroegere waarnemingen omtrent de overgang van uronzuren in pentosen en van poly-uronzuren in pentosanen.

In 1902 is het reeds aan C. NEUBERG en E. SALKOWSKI (175) gelukt uit glucuronzuur xylose te verkrijgen door dit zuur aan een rottende vloeistof toe te voegen.

Evenzoo geven E. J. CANDLIN en S. B. SCHRIJVER (29) aan, dat bij verhitting van hun pectinezuur met verdunde alkali een belangrijk percentage koolzuur afgesplitst wordt, waarbij een hemicelluloseachtige verbinding zou ontstaan. Door verhitting van zijn citroenpectine in een autoclaaf op 153° C., verkreeg F. V. LINGGOOD (139) eveneens een product, dat de eigenschappen van een hemicellulose bezat.

C. M. CONRAD (40) was de eerste onderzoeker, die nagegaan heeft, of er bij de decarboxyleering van zuiver galacturonzuur arabinose ontstaat. Hij was tot dit onderzoek gekomen door het feit, dat R. B. MC. KINNIS (157) en ook G. F. AHMANN (5) de opvatting van vroegere onderzoekers (50, 64, 99, 100, 270), dat in de pectine gebonden arabinose voorkomt, in twijfel trokken. MC. KINNIS onderstelde, dat de pentose, die men bij analyse van de pectine vindt, daarin niet gebonden voorkomt, doch beschouwd moet worden als een, bij de analyse gevormd, ontledingsproduct van het galacturonzuur, dat in de pectine voorkomt.

CONRAD heeft deze kwestie systematisch onderzocht en als uitgangspunt zuiver bariumgalacturonaat genomen. Dit bariumzout werd met 4%-ig zwavelzuur gekookt. Bij deze zuurconcentratie heeft reeds een belangrijke decarboxyleering plaats (39, 141). Zooals in het volgende hoofdstuk zal blijken, wordt bij deze zuurconcentratie arabinose *niet* ontleed. De, bij de decarboxyleering van galacturonzuur gevormde, arabinose zou dus in de reactievloeistof aangetoond moeten kunnen worden.

Het gelukte CONRAD echter niet, om daarin arabinose onder de ontledingsproducten te vinden.

Deze onderzoekingen zijn door ons herhaald en uitgebreid, daar dit onverwachte resultaat de hypothese, dat de pentosen in de plant uit de uronzuren ontstaan, onwaarschijnlijk zou maken.

§ 4. Het gedrag van natriumglucuronaat bij koken met verdund zwavelzuur.

Het is ons zonder moeite gelukt om uit natriumglucuronaat, door koken met verdund zwavelzuur, xylose te verkrijgen. De proef, die eenige malen herhaald is, werd als volgt uitgevoerd :

4.25 g natriumglucuronaat werden in 100 cm³ 4%-ig zwavelzuur opgelost en daarna gedurende 5 uren in een rondkolf (inhoud 500 cm³) met terugvloeikoeler gekookt. Na 5 uren was de kleur der oplossing bruin en kon furfural aangetoond worden (met aniline en ijszijn ontstond een intensieve roodkleuring).

Vervolgens werd de oplossing met bariumcarbonaat geneutraliseerd en van het gevormde neerslag afgefiltreerd. Het filtraat werd in vacuüm tot 15 cm³ ingedampt. Hieraan werd 250 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd, waardoor het onontlede natriumglucuronaat, ten deele amorf, ten deele als stroop, neersloeg.

De vloeistof werd, na filtratie, opnieuw in vacuüm tot een klein volume ingedampt, waarna weer overmaat alcohol toegevoegd werd. De gekleurde, soms troebele, oplossing werd, na behandeling met noriet, in vacuüm volledig ingedampt. Het residu werd in 1 cm³ water opgenomen.

De op deze wijze verkregen oplossing reduceerde FEHLING's proefvocht. Met de reactie van BERTRAND (79) werd de aanwezigheid van xylose in de oplossing als volgt aangetoond:

Aan de oplossing (1 cm³) werden 500 mg cadmiumcarbonaat en 7 druppels broom toegevoegd. Dit mengsel werd eenige tijd op het waterbad verwarmd. Na 12 uren staan werd volledig ingedampt, waarna het residu in 5 cm³ water werd opgenomen. De vloeistof werd gefiltreerd en vervolgens tot 1 cm³ ingedampt. Hieraan werd 1 cm³ absolute alcohol toegevoegd. Na eenige tijd ontstond een precipitaat, dat, na filtratie, in 1 cm³ water opgelost werd, waarna opnieuw 1 cm³ absolute alcohol werd toegevoegd. Het nu gevormde kristallijne neerslag bestond uit bootvormige kristallen, die voor de, uit xylose zich vormende, dubbelverbinding karakteristiek zijn.

Het leek ons nu evenwel wenschelijk om na te gaan, of de xylose als verontreiniging in ons natriumglucuronaat aanwezig geweest kon zijn. Dit bleek echter niet het geval te zijn.

Hiertoe werden 6.5 g van dit natriumzout in water opgelost en daarna met overmaat 96%-ige alcohol neergeslagen, waarbij dus de eventueel aanwezige xylose opgelost bleef. Na filtratie werd de oplossing in vacuüm tot 10 cm³ ingedampt, waarna opnieuw overmaat 96%-ige alcohol toegevoegd werd.

De zoo verkregen, soms troebele, oplossing werd met noriet ontkleurd en vervolgens afgefiltreerd. Het filtraat werd in vacuüm volledig ingedampt, waarna het residu in 1 cm³ water opgenomen werd. Met behulp van de reactie van BERTRAND werd weer getracht xylose in deze oplossing aan te toonen, welke reactie evenwel negatief uitviel.

Een laatste punt, dat wij meenden te moeten onderzoeken, was, of natriumglucuronaat een soortgelijke reactie met cadmiumcarbonaat en broom vertoonde als xylose. Het was n.l. denkbaar, dat het natriumglucuronaat niet volledig uit de oplossing verwijderd was. Natriumglucuronaat bleek echter de reactie niet te geven.

§ 5. Het gedrag van bariumgalacturonaat bij koken met verdunde zuren.

Nadat het ons gelukt was om na koken van glucuronzuur met 4%-ig zwavelzuur xylose in de reactievloeistof aan te toonen, was het des te belangwekkender om na te gaan, welke wel de oorzaak mocht zijn van de negatieve resultaten, die door CONRAD verkregen waren.

Wij hebben de proef nu allereerst volkomen analoog aan de door CONRAD beschreven methode uitgevoerd en wel door bariumgalacturonaat gedurende vijf uren met 4%-ig zwavelzuur te koken.

In een rondkolfje (500 cm³) met terugvloeikoeler werden 5 g bariumgalacturonaat, die in 100 cm³ 4%-ig zwavelzuur opgelost waren, gedurende 5 uren gekookt.

De kleur der oplossing was bruin geworden en er was furfurol ontstaan. Na neutralisatie met bariumcarbonaat werd gefiltreerd, waarna het filtraat in vacuüm tot 15 cm³ werd ingedampt. Hieraan werden 150 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd.

Het neerslag werd afgefiltreerd en daarna werd de oplossing opnieuw in vacuüm ingedampt, waarna weer overmaat 96%-ige alcohol aan de vloeistof werd toegevoegd. Na filtratie werd ontkleurd en in vacuüm volledig ingedampt. Het residu werd in 2 cm³ water opgenomen. Vervolgens werd getracht om in deze oplossing arabinose met diphenylhydrazine, zooals hierna beschreven is, aan te toonen. Na eenige tijd sloeg er een donker harsachtig residu neer.

Wij verkregen hierbij, evenals genoemde onderzoeker, negatieve resultaten, met dien verstande, dat de reactievloeistof met diphenylhydrazine geen kristallijn hydrazon opleverde. Bij deze reactie werd een donker harsachtig residu verkregen, dat na 2 maanden nog niet gekristalliseerd was.

Alvorens nu evenwel uit dit negatieve resultaat een conclusie getrokken mocht worden, moesten wij nagaan, in welke concentratie arabinose nog met diphenylhydrazine aangetoond kon worden. Hiertoe werden aan 10 cm³ van arabinose-oplossingen van afnemende concentraties 15 cm³ 96%-ige alcohol en 200 mg, met petroleum-aether uitgewassen, kristallijne diphenylhydrazine (172, 174) toegevoegd, uit welk mengsel zich, bij aanwezigheid van een voldoende hoeveelheid arabinose, na ruim 24 uren staan bij kamertemperatuur, het hydrazon als kristalnaalden afscheidde (smpt: 204° C.). Onder deze omstandigheden bleek, dat 10 mg arabinose nog gemakkelijk aangetoond konden worden. Hieruit volgt dus, dat het negatieve resultaat niet te wijten was aan een geringe gevoeligheid van de reactie.

In de tweede plaats is nu getracht om de sterk reduceerende bijproducten, die bij de decarboxyleering van galacturonzuur met zwavelzuur ontstaan (zie het volgende hoofdstuk), onschadelijk te maken. Deze bijproducten geven waarschijnlijk met diphenylhydrazine de donkergekleurde oplossing en het harsachtige precipitaat.

Die reduceerende substanties werden verwijderd door oxydatie met broom bij 0° C. Onder deze omstandigheden bleek arabinose echter eveneens geoxydeerd te worden.

Aan 200 mg arabinose, die in 25 cm³ water opgelost waren, werden 2 cm³ broom toegevoegd, waarna het rondkolfje gedurende 24 uren in een ijskast geplaatst werd. De overmaat broom werd verwijderd door lucht door de oplossing te leiden. Vervolgens werd de oplossing in vacuüm ingedampt en het residu in water opgenomen. Na ontcleuring met noriet werd gereageerd met diphenylhydrazine op arabinose, welke reactie echter negatief uitviel.

In de derde plaats vroegen wij ons af, in hoeverre het furfurol, dat bij de proef gevormd werd, wellicht een storende invloed kon uitoefenen op de kristallisatie van het arabinosediphenylhydrazon. Ten einde dit na te gaan, mengden wij furfurol en arabinose in verschillende verhoudingen en reageerden op de zoo verkregen mengsels met diphenylhydrazine. Het bleek ons daarbij, dat een kristallisatie van het arabinosediphenylhydrazon slechts plaats had, indien de verhouding arabinose : furfurol groter dan 2 (250 mg arabinose, 125 mg furfurol) was. Was deze verhouding kleiner, dan kon de arabinose niet meer aangetoond worden en vormden zich uitsluitend plaatjes van furfuroidiphenylhydrazon, die door hun andere kristalvorm gemakkelijk van arabinosediphenylhydrazon te onderscheiden waren.

Hieruit bleek dus, dat men, alvorens op arabinose in het reactiemengsel te reageren, het furfurol zooveel mogelijk verwijderen moest. Die verwijdering bleek volledig mogelijk te zijn door het furfurol over te stoomen en wij pasten dan ook zulk een overstooming geregeld toe. Bij uitvoering van de proef volgens CONRAD, met inachtneming van overstoomen, bleek evenwel nog geen arabinose onder de ontledingsproducten aangetoond te kunnen worden.

Bij nader onderzoek bemerkten wij intusschen, dat het furfurol, gedurende het indampen van het reactiemengsel in vacuüm, reeds grootendeels verdwenen was. Men zou dus verwachten, dat het overstoomen geen werking uitoefende. Het zal echter blijken, dat dit geenszins het geval is.

Een volgende overweging was, of het zuur, waarmede het uronzuur gekookt werd, misschien oorzaak was van een snelle omzetting van de, bij de decarboxyleering in status nascendi gevormde, arabinose in furfurool. Het is immers een feit, dat zwavelzuur in een te groote concentratie wateronttrekkend werkt, op welke eigenschap de furfuroolvorming uit de pentosen berust. Om deze invloed te verminderen, hebben wij soortgelijke bewerkingen uitgevoerd met zwavelzuur van een kleinere concentratie.

Bij uitvoering van de proef met 2%-ig zwavelzuur bleek het nu inderdaad mogelijk om met diphenylhydrazine arabinose onder de ontledingsproducten aan te toonen.

10 g bariumgalacturonaat werden in 200 cm³ 2%-ig zwavelzuur opgelost en in een rondkolf met terugvloeiakoeler gedurende 6 uren gekookt. Met aniline en ijsazijn kon furfurool in de oplossing aangetoond worden. Na neutralisatie met bariumcarbonaat werd het gevormde neerslag afgefiltreerd en het filtraat met noriet ontkleurd. Vervolgens werd de oplossing in vacuüm tot ongeveer 30 cm³ ingedampt, waarna 300 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd werden. Nadat het gevormde precipitaat afgefiltreerd was, werd de oplossing nogmaals in vacuüm ingedampt. De in water opgenomen stroop werd nu door overstoomen met waterdamp gezuiverd. Na deze bewerking werd de oplossing met noriet ontkleurd en in vacuüm tot 10 cm³ ingedampt.

Deze oplossing reduceerde FEHLING's proefvocht en bevatte geen barium. De naphthoresorcine-reactie viel negatief uit, indien wij met benzol uitschudden, daarentegen positief bij uitschudden met aether. Ten slotte werd deze oplossing nog éénmaal met noriet ontkleurd, waarna met diphenylhydrazine op arabinose gereageerd werd. Er ontstond een kristallijn neerslag, dat volkomen op de kristalnaalden van arabinosediphenylhydrazon geleek.

De decarboxyleering werd eveneens uitgevoerd met zuren, die de wateronttrekkende werking in geringere mate vertoonen dan zwavelzuur, n.l. oxaalzuur en fluorwaterstofzuur. Bij uitvoering der proef met 5%-ig oxaalzuur kon, bij overigens dezelfde werkwijze, evenmin arabinose in de reactievloeistof aangetoond worden. Met diphenylhydrazine werd een zwart, amorf precipitaat gevormd.

Bij toepassing van kleinere zuurconcentraties kon evenwel weer arabinose aangetoond worden. Zoo kon bij gebruik van 1,3%-ig oxaalzuur, zoowel als van 1%-ig fluorwaterstofzuur, arabinose onder de ontledingsproducten van galacturonzuur gevonden worden.

Uit 5.75 g bariumgalacturonaat werd met een geringe ondermaat zwavelzuur het galacturonzuur vrijgemaakt. Bij het filtraat werd vervolgens zooveel fluorwaterstofzuuroplossing gevoegd, dat het totale volume 100 cm³ bedroeg. De concentratie van het fluorwaterstofzuur in deze oplossing bedroeg 0.99%. Deze oplossing werd gedurende 6 uren in een rondkolfje met terugvloeiakoeler gekookt, waarbij weer furfurool ontstaan was.

Vervolgens werd met bariumcarbonaat geneutraliseerd, gefiltreerd en het filtraat

met noriet ontleurd. Bij indampen in vacuüm van het filtraat tot ongeveer 30 cm³ ontstond een precipitaat, dat afgefiltreerd werd en een mengsel van bariumfluoride en bariumsilicofluoride bleek te zijn.

Aan het filtraat werden 300 cm³ 96%-ige alcohol toegevoegd, ten einde het onontlede bariumgalacturonaat neer te slaan. Na filtreren werd de oplossing in vacuüm ingedampt, waarna opnieuw overmaat alcohol toegevoegd werd. De eventueel gevormde troebeling werd door een behandeling met noriet verwijderd. De, bij het indampen van het filtraat gevormde, stroop werd in water opgenomen en door overstoomen gezuiverd. De vloeistof werd met noriet en iets bariumcarbonaat verwarmd, waarna het filtraat in vacuüm tot ongeveer 10 cm³ ingedampt werd. In deze oplossing bleek arabinose gemakkelijk met diphenylhydrazine aangetoond te kunnen worden.

Om, ter nadere identificatie van dit hydrazon, het smeltpunt van een voldoende gereinigd product te kunnen bepalen, werd deze zelfde bewerking herhaald met een grootere hoeveelheid bariumgalacturonaat (20 g), waarbij een product verkregen werd, dat na omkristallisatie uit alcohol en pyridine (82) een smeltpunt van 198—202° C. had. De kristallen werden gemengd met een, uit zuivere arabinose bereid, diphenylhydrazon, welk mengsel eveneens een smeltpunt van 198—201° C. had.

Er bestaat dus geen twijfel aan, dat inderdaad arabinose was gevormd.

§ 6. Het gedrag van mannuronzuur ten opzichte van verdund zwavelzuur.

Uit het mannuronzuur zou bij koolzuurafplitsing d-lyxose ontstaan. Ten einde de lyxose te kunnen identificeren werd in de eerste plaats lyxose synthetisch uit galactose bereid.

De in de literatuur opgegeven bereidingswijzen van lyxose, met als uitgangspunt galactose, verlopen alle over galactonzuur. Uit het galactonzuur bereidde M. R. A. WEERMAN lyxose door oxydatie van het amide van het galactonzuur met natriumhypochloriet (263). Andere onderzoekers hebben dit doel bereikt door zogenaamde „gerichte” oxydatie van calciumgalactonaat. Volgens deze laatste methode is ook door ons lyxose bereid.

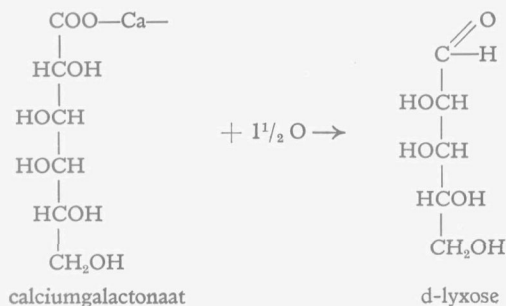
Bereiding van calciumgalactonaat. G. H. A. CLOWES en B. TOLLENS (36) oxydeeren galactose met broom in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat. M. HÖNIG en W. RUZICKA (211) verkrijgen een zeer goed rendement door galactose met chloorkalk en calciumhydroxyde, in tegenwoordigheid van kwartslicht, te oxydeeren. Deze laatste methode is echter tijdrovend vanwege de kleine concentratie der suikeroplossing, die hierbij gebruikt wordt.

H. KILIANI (118) verkreeg het galactonzuur door oxydatie van galactose met salpeterzuur (s.g. 1,2.) In 1932 (121) geeft dezelfde onderzoeker een electrolytische bereiding van calciumgalactonaat; deze bereiding verloopt in tegenwoordigheid van calciumcarbonaat en calciumbromide. Het rendement bedraagt 60—70%. Ten tijde van onze bereiding van het calciumzout was deze laatste methode nog niet gepubliceerd. Door ons is het calciumgalactonaat nog bereid volgens G. H. A. CLOWES en B. TOLLENS, welke methode ook door W. N. HAWORTH en E. L. HIRST (91) toegepast werd.

40 g galactose werden in 300 cm³ water opgelost, waaraan 40 g calciumcarbonaat toegevoegd werden. Vervolgens werden uit een buret 45 g broom druppelsgewijze toegevoegd, welk broom na goed schudden in de vloeistof oploste. Na 24 uren staan werd de overmaat broom met lucht uitgedreven, waarna de gefiltreerde oplossing met nieuw calciumcarbonaat op het waterbad verhit werd. Na filtratie werd de bruine gekleurde oplossing in vacuüm tot een klein volume ingedampd. Aan de, met noriet ontkleurde, oplossing werd overmaat alcohol toegevoegd, waardoor het calciumgalactonaat als een volkomen witte, amorphe stof neergeslagen werd. Dit product was echter verontreinigd met calciumbromide. De zuivering geschiedde door het ruwe product in water op te lossen en met alcohol te precipiteeren. Dit werd driemaal herhaald. Opbrengst: 30 g.

Deze proef werd nogmaals herhaald, ten einde een voldoende hoeveelheid calciumgalactonaat te verkrijgen. Er werd een weinig in gekristalliseerde toestand verkregen, door het amorphe zout in weinig water op te lossen en deze oplossing in vacuüm boven zwavelzuur in te laten dampen. Voor de lyxosebereiding was het echter niet noodzakelijk, dat het calciumgalactonaat gekristalliseerd was.

Bereiding van lyxose. Uit het calciumgalactonaat werd de lyxose volgens de methode van O. RUFF en G. OLLENDORFF (210) bereid. Daartoe werd calciumgalactonaat met waterstofperoxyde in tegenwoordigheid van ferriacetaat geoxydeerd, welke reactie door de volgende vergelijking voorgesteld kan worden:



Aan 40 g, in 900 cm³ water opgelost, calciumgalactonaat werden 296 cm³ waterstofperoxyde-oplossing en 30 cm³ 30%-ige ferriacetaatoplossing toegevoegd. De waterstofperoxyde-oplossing was gesteld met kaliumpermanganaat en was 0.1855-n (3.21%). Voor de oxydatie van 40 g calciumgalactonaat waren, volgens bovenstaand schema, 296 cm³ der waterstofperoxyde-oplossing nodig. Bij toevoeging der peroxyde-oplossing en ferriacetaat had er een langzame koolzuurontwikkeling plaats. Wij lieten het reactiemengsel gedurende 24 uren staan. Er was een weinig bruin colloïdaal neerslag ontstaan, dat afgefiltreerd werd. Het filtraat werd in vacuüm bij 35° C. tot een stroop ingedampt. Hieraan werden 300 cm³ absolute alcohol toegevoegd; het product werd goed uitgekneed, tot het volkomen pulverig geworden was.

Na filtratie werd het neerslag in water opgelost en opnieuw met absolute alcohol geprecipiteerd. In de beide vereenigde alcoholische filtraten was nu de lyxose aanwezig.

Uit deze onzuivere oplossing kristalliseerde de lyxose bij indampen niet.

De zuivering geschiedde door uit de alcoholische oplossing met de berekende hoeveelheid p-broomphenylhydrazine de lyxose als p-broomphenylhydrazon af te scheiden.

De totale hoeveelheid lyxose werd bepaald door een furfurolobepaling in 10 cm³ der onzuivere lyxose-oplossing (totaal volume bedraagt 140 cm³) te verrichten. In de ruwe alcoholische lyxose-oplossing bleken 3.2 g lyxose aanwezig te zijn.

De oplossing werd nu in vacuüm ingedampt, waarna de berekende hoeveelheid (3.98 g) p-broomphenylhydrazine, in weinig alcohol opgelost, toegevoegd werd. Het p-broomphenylhydrazon kristalliseerde uit. Verdere uitkristallisatie werd bereikt door water aan het reactiemengsel toe te voegen. Opbrengst: 5.1 g.

Smpt. (na omkristallisatie uit alcohol): 154—156° C. (smpt. lyxose-p-broomphenylhydrazon volgens literatuuropgaven: 156—157° C.).

Uit dit broomphenylhydrazon werd de lyxose verkregen door ontleding van het hydrazon met benzaldehyde (83).

4 g p-broomphenylhydrazon werden met 3.2 g benzaldehyde, 30 cm³ 96%ige alcohol en 20 cm³ water in een rondkolfje met terugvloeiakoeler gedurende 5 uren op het waterbad verhit.

Bij afkoeling kristalliseerde het benzaldehyde-p-broomphenylhydrazon uit. Nadat in vacuüm bij 35° C. de alcohol afgedampt was, werd eenige malen met aether uitgeschud, ten einde de overmaat benzaldehyde en benzoëzuur te verwijderen. De oplossing werd nu in vacuüm tot een dunne stroop ingedampt en in een kristalliseerschaaltje in vacuüm boven geconcentreerd zwavelzuur geplaatst. Na enting kristalliseerde de lyxose uit. Opbrengst: 1.8 g. Smpt. (na omkristallisatie uit alcohol): 114° C.

De verkregen lyxose hebben wij vergeleken met het *decarboxyleeringsproduct* van mannuronzuur. Bij deze decarboxyleering werd een enigszins andere werkwijze toegepast dan bij de decarboxyleering van glucuronzuur en galacturonzuur.

Hier hebben wij n.l. het polymannuronzuur en niet het mannuronzuur zelf met zwavelzuur gekookt. Wij hadden dus in dit geval slechts het alcoholische filtraat, dat wij bij de bariummannuronaatbereiding uit polymannuronzuur A of B verkregen, op lyxose te onderzoeken. Een overeenkomstige werkwijze was niet mogelijk in het geval van glucuronzuur of galacturonzuur, daar de uitgangs-

producten daarvan geen zuivere poly-uronzuren waren, doch andere suikers in de ketens droegen.

Alvorens het alcoholische filtraat op lyxose te onderzoeken, werd dit allereerst op xylose en arabinose onderzocht, daar men veelal van meening is, dat het uit de zeewieren geëxtraheerde poly-uronzuur een mengsel van verschillende uronzuren zou zijn. Het bleek evenwel, dat er noch arabinose, noch xylose in de reactievloeistof aangetoond kon worden.

De na 18 uren koken van 80 g polymannuronzuur B met 2.5%-ig zwavelzuur verkregen reactievloeistof werd, na indamping en verwijdering van bariummannuronaat met overmaat alcohol, in vacuüm ingedampt, waarna opnieuw overmaat 96%-ige alcohol toegevoegd werd.

Het met noriet ontkleurde alcoholische filtraat werd in twee gelijke volumina gesplitst. De eene helft werd ingedampt en op xylose onderzocht. *De reactie van Bertrand viel echter negatief uit.*

De andere helft werd in vacuüm ingedampt en in 10 cm³ water opgenomen.

Met *diphenylhydrazine* werd op *arabinose* gereageerd, welke reactie eveneens *negatief* uitviel.

Ook kon geen xylose onder de decarboxyleeringsproducten van polymannuronzuur A aangetoond worden.

Vervolgens werd de reactievloeistof van polymannuronzuur B op lyxose onderzocht. Daartoe werd met p-broomphenylhydrazine op lyxose gereageerd. Hierbij kristalliseerde, zooals reeds in een vorig hoofdstuk is beschreven, het fucosebroomphenylhydrazon uit, doch niet het lyxosehydrazon. Na affiltratie van het fucosebroomphenylhydrazon werd voorzichtig water aan het alcoholische filtraat toegevoegd. Er werd een rood, amorf precipitaat verkregen, dat niet kristalliseerde. Dit precipitaat werd vervolgens met benzaldehyde ontleed, waarna de oplossing, na filtratie en uitschudden met aether, met broom geoxydeerd werd.

Bij aanwezig zijn van lyxose zou deze suiker tot d-arabo-trioxyglutaarzuur geoxydeerd worden.

Inderdaad werd een oxydatieproduct verkregen, dat een cinchoninezout leverde met een smeltpunt van 222—223° C. en waarvan vermoed werd, dat het het zout van d-arabo-trioxyglutaarzuur was.

Ter identificatie werd het cinchoninezout van de door broom tot trioxyglutaarzuur geoxydeerde, kristallijne lyxose bereid, dat eveneens een smeltpunt van 223° C. bleek te hebben.

80 g polymannuronzuur B werden, zooals bij de bereidingswijze van bariummannuronaat in hoofdstuk VIII aangegeven is, met 4 l 2.5%-ig zwavelzuur gekookt (18 uren in 2 trappen). Na filtratie werd de geneutraliseerde oplossing in vacuüm ingedampt en

het bariummannuronaat met overmaat alcohol neergeslagen. Het alcoholische filtraat werd in vacuüm ingedampt, waarna opnieuw overmaat alcohol toegevoegd werd. Na indamping in vacuüm van de, met noriet ontkleurde, alcoholische oplossing, werd het residu in weinig 96%-ige alcohol opgenomen.

Bij toevoeging van, in weinig alcohol opgeloste, p-broomphenylhydrazine werd een kristallijn precipitaat van fucosebroomphenylhydrazon gevormd, dat afgefiltreerd werd.

Lyxosehydrazon kristalliseerde, ook na enting, niet uit. Bij toevoeging van water werd een amorf neerslag verkregen. Het amorfe neerslag werd met benzaldehyde ontleed (83). Na affiltratie van het, bij afkoeling gekristalliseerde, benzaldehyde-p-broomphenylhydrazon, werd de alcohol afgedampt en de waterige oplossing eenige malen met aether uitgeschud.

De waterige oplossing werd vervolgens met broom bij kamertemperatuur geoxydeerd (2×24 uren). De overmaat broom en het broomwaterstofzuur werden bij het indampen van de oplossing op het waterbad tot een klein volume grootendeels verwijderd. Dit indampen mag niet zoover geschieden, dat er ontleding plaats grijpt. De zoo verkregen oplossing werd met bariumcarbonaat geneutraliseerd. Na de overmaat bariumcarbonaat afgefiltreerd te hebben, werd de oplossing tot koken verhit. Hieraan werd een, in een mortier fijngewreven, kleine ondermaat cinchoninesulfaat toegevoegd. Het bariumsulfaat werd afgefiltreerd, waarna het cinchoninezout van het d-arabo-trioxyglutaarzuur uitkristalliseerde. Smpt.: $222-223^{\circ}$ C. Zooals hierboven werd medegedeeld, is dit inderdaad het smeltpunt van het cinchoninezout van d-arabo-trioxyglutaarzuur.

De pentosen, die bij oxydatie d-arabo-trioxyglutaarzuur geven zijn: d-arabinose en d-lyxose. Verder geeft ook fucose bij oxydatie d-arabo-trioxyglutaarzuur. Het fucose-p-broomphenylhydrazon is echter zeer onoplosbaar en kristalliseert gemakkelijk uit. Daarmede kunnen wij niet te maken hebben gehad. Het amorf verkregen hydrazon gaf dan ook geen methylpentose-reactie van Rosenthaler, hetgeen wel het geval was met het, door affiltreren verwijderde, eerst uitgekristalliseerde broomphenylhydrazon van fucose. De stof is dus d-arabinose of d-lyxose. De waarschijnlijkheid is groot, dat het inderdaad lyxose is, daar d-arabinose moeilijk uit d-mannuronzuur ontstaan gedacht kan worden.

Samenvatting.

1e. Als decarboxyleeringsproduct van glucuronzuur en galacturonzuur werden resp. d-xylose en l-arabinose aangetoond.

2e. Het werd waarschijnlijk gemaakt, dat het decarboxyleeringsproduct van d-mannuronzuur d-lyxose is. De identificatie geschiedde door het decarboxyleeringsproduct met de synthetisch uit galactose bereide lyxose te vergelijken.

3e. Deze resultaten maken de hypothese, dat de pentosen in de plantenwereld uit de overeenkomstige uronzuren ontstaan, waarschijnlijker.

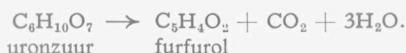
HOOFDSTUK XIII.

De furfurol- en koolzuurvorming uit uronzuren.

De furfurolvorming.

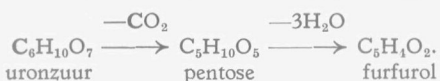
§ 1. Mogelijkheden voor het verloop der furfurolvorming.

Bij koken van een uronzuur met een mineraalzuur ontstaat furfurol volgens de vergelijking:



Volgens deze vergelijking bestaan er de volgende mogelijkheden voor de furfurolvorming:

1e. *Eerst koolzuur-, vervolgens waterafsplitsing:*



2e. *Gelijktijdige koolzuur- en waterafsplitsing.*

3e. *Eerst volledige waterafsplitsing, vervolgens koolzuurafsplitsing:*



4e. *Afsplitsing van 2 moleculen water, vervolgens decarboxyleering en daarna afsplitsing van het derde watermolecuul.*

5e. *Afsplitsing van 1 molecuul water, decarboxyleering en ten slotte afsplitsing van nog 2 moleculen water.*

Deze mogelijkheden zijn voor galacturonzuur en ten deele ook voor glucuronzuur en voor mannuronzuur onderzocht.

§ 2. Onderzoek van de eerste mogelijkheid.

Ten einde na te gaan, of de reactie volgens de sub 1 genoemde onderstelling verloopt, werden de reactieomstandigheden zóó gekozen, dat een volledige omzetting van uronzuur in furfurol niet plaats kon grijpen. Vervolgens werd getracht om het gevormde tusschenproduct te isoleren.

Daartoe werd galacturonzuur gedurende 6 uren gekookt met 2%-ig zwavelzuur (zie hoofdstuk XII). Bij deze zuurconcentratie werd een belangrijk percentage koolzuur van galacturonzuur afgesplitst (zie hieronder), terwijl bij koken van arabinose met 2%-ig zwavelzuur geen furfurol gevormd werd (zie tabel VIII).

De koolzuurbepaling werd volgens de methode van K. LEFÈVRE en B. TOLLENS (133), met de modificatie van A. C. SLOEP (229), uitgevoerd.

5 g bariumgalacturonaat werden gedurende 6 uren met 100 cm³ 2%-ig zwavelzuur gekookt. Een koolzuurvrije luchtstroom voerde het, van galacturonzuur afgesplitste, koolzuur door verschillende waschfleschjes met bekende hoeveelheden barietoplossing, waar het koolzuur geabsorbeerd werd. De overmaat bariet werd met zwavelzuur teruggetitreerd.

Bij de bepaling in duplo werden de volgende uitkomsten verkregen.

Verbruikt: 42.7 (43.0) cm³ 0.1-n barietopl. Dit komt overeen met 93.9 (94.7) mg CO₂, dus met 320 (323) mg *arabinose*, dus met 557 (562) mg *bariumgalacturonaat*.

Door 5 g bariumgalacturonaat gedurende 6 uren met 100 cm³ 2%-ig zwavelzuur te koken, zou, indien de furfurolvorming volgens de sub 1 genoemde onderstelling verloopt, in de reactievloeistof 320 mg arabinose aanwezig zijn. De hoeveelheid arabinose, die aangetoond kon worden, bedroeg echter slechts enkele milligrammen. Met glucuronzuur werd een analoog resultaat verkregen.

Dit resultaat toonde aan, dat de furfurolvorming slechts gedeeltelijk over pentose verliep. Het is dus waarschijnlijk, dat de vorming grootendeels langs een andere weg verloopt.

Ter verdere toetsing van de eerste onderstelling werd de reactiesnelheid der furfurolvorming, enerzijds uit galacturonzuur, anderzijds uit arabinose, nagegaan. Indien de snelheid van de laatste reactie veel kleiner is dan die der eerste (en dit blijkt het geval te zijn), dan is de vorming van pentose als tusschenproduct van de eerste reactie zeer onwaarschijnlijk.

In een rondkolfje van 250 cm³ inhoud werden 15 g bariumgalacturonaat en 150 cm³ 2%-ig zwavelzuur gebracht. Het kolfje werd door een caoutchoucstop, waarin 2 openingen waren aangebracht, afgesloten. Door de eene opening ging een trechter, door de andere een spatbol, waaraan een koeler bevestigd was.

Het kolfje werd in een metaalbad, dat op constante temperatuur gehouden werd, verwarmd. Wanneer 30 cm³ vloeistof overgedestilleerd waren, werden deze in een Erlenmeyerkolf van 400 cm³ gebracht, die in ijs geplaatst was, waarna door de trechter weer 30 cm³ water in het kolfje werden toegevoegd. Vervolgens werden weer 30 cm³ vloeistof overgedestilleerd, weer 30 cm³ water door de trechter toegevoegd, enz.

Na 1 uur werd aan het verzamelde destillaat zooveel geconcentreerd zoutzuur toegevoegd, dat de zoutzuurconcentratie in de gezamenlijke oplossing 12% bedroeg.

Hieraan werd vervolgens phloroglucine, in 12%-ig zoutzuur opgelost, toegevoegd, waarna de volgende dag het gevormde neerslag afgefiltreerd en na 4 uren drogen (97—100° C.) gewogen werd.

Zoo werd achtereenvolgens met de destillaten, opgevangen in het eerste uur, het tweede uur, enz., gehandeld.

De resultaten van de proefnemingen van de furfurolvorming uit galacturonzuur zijn in de onderstaande tabel weergegeven.

TABEL VII.

Furfurolvorming uit galacturonzuur (5 g bariumgalacturonaat, 150 cm ³ 2%-ig zwavelzuur)						
Proef	Minuten	Temp. bad in °C.	Opgevan- gen destil- laat in cm ³	Toegevoegd		Furfurol- phloroglucide in mg
				gec. zout- zuur in cm ³	phloroglucine zoutz. in cm ³	
A	0—60	126	149.5	72	15	3.6
	60—120	126	144	69.5	20	8.1
	120—180	126	142.5	68.5	15	10.1
B	0—60	119	119	57	15	3.2
	60—120	119	110	53	15	6.5
	120—180	120	106	51	15	8.0
	180—360	121	332	159	30	26.5

Reeds na 15 minuten koken kon bij bovenbedoelde proeven het furfurol in het destillaat met aniline-acetaat aangetoond worden.

Vervolgens werd deze zelfde proef met arabinose herhaald. Hiertoe werden 300 mg arabinose met 150 cm³ 2%-ig zwavelzuur gekookt, en het gevormde furfurol op de hierboven beschreven wijze bepaald. Van de pentose werden 300 mg genomen, aangezien er, bij verloop van de furfurolvorming volgens de sub 1 genoemde onderstelling, bij koken van 5 g bariumgalacturonaat met 150 cm³ 2%-ig zwavelzuur gedurende 6 uren, ongeveer 300 mg arabinose, blijkens de hoeveelheid afgesplitste koolzuur (zie boven), zouden ontstaan zijn. De uitkomsten van deze proef met arabinose zijn hieronder weergegeven.

TABEL VIII.

Furfurolvorming uit arabinose (300 mg arabinose, 150 cm ³ 2%-ig zwavelzuur)					
Minuten	Temp.bad in °C.	Opgevangen destillaat in cm ³	Toegevoegd		Furfurol- phloroglucide in mg
			gec. zoutzuur in cm ³	phloroglucine- zoutz. in cm ³	
0—60	121	135	65	15	0
60—120	122	140.5	67.5	15	0
120—180	122	141.5	68	15	0
180—270	123	242	116	15	0

Bij toevoeging van phloroglucine-zoutzuur aan het, met zoutzuur aangezuurde destillaat, kleurde de oplossing zich eerst geel, daarna groen, doch er werd geen neerslag gevormd.

Terwijl dus uit galacturonzuur vrij groote hoeveelheden furfurol gevormd waren bleek onder gelijke omstandigheden uit arabinose geen furfurol te ontstaan. Op grond van de uitkomsten dezer proeven is dus een belangrijke vorming van pentose als tusschenproduct bij de reactie onwaarschijnlijk te achten.

§ 3. Onderzoek van de tweede mogelijkheid.

Er blijft nog een verklaringmogelijkheid van de bovenstaande resultaten over, in deze zin, dat de, bij de behandeling van een uronzuur met een mineraalzuur intermediair gevormde, pentose, op het moment van ontstaan, gemakkelijker water afsplitst dan de eenmaal gevormde pentose.

Deze verklaring is echter niet van de sub 2 genoemde onderstelling te onderscheiden. Een direct bewijs voor zulk een reactieverloop is niet te geven. Wij zullen echter zien, dat, daar de andere mogelijkheden onhoudbaar blijken te zijn, deze tweede mogelijkheid overblijft.

§ 4. Onderzoek van de derde mogelijkheid.

Ten einde na te gaan of de furfurolvorming over het, door afsplitsing van drie moleculen water gevormde, furfurolcarbonzuur-5 verloopt, hebben wij het furfurolcarbonzuur-5 als tusschenproduct trachten te isoleren.

Daartoe werd de carboxylgroep van galacturonzuur als bariumzout vastgelegd. Vervolgens werd nu een waterafsplitsing bewerkstelligd door dit bariumgalacturonaat met oververhitte stoom te verhitten.

Hierbij werd aangenomen, dat de waterafsplitsing van uronzuren bij de behandeling met oververhitte waterdamp op dezelfde wijze geschiedt, als bij de, tot furfurolvorming voerende, *zuurbehandeling*. Deze onderstelling vindt een zekere steun in het feit, dat bij de inwerking van oververhitte stoom op pentosen en pentosanen furfurol ontstaat (131, 132).

De werkwijze was als volgt:

Porties van 100 cm³ van een 5%-ige, waterige bariumgalacturonaatoplossing werden gedurende bepaalde, toenemende tijden met stoom onder druk bij verschillende temperaturen in een autoclaaf verhit. Het gevormde bruine neerslag werd afgefiltreerd en het filtraat met noriet ontleurd. Vervolgens werd met overmaat alcohol het bariumzout neergeslagen.

Van deze porties bariumzout werden nu in de eerste plaats bariumbepalingen uitgevoerd (zie tabel IX), daar een toename van het bariumgehalte op de aanwezigheid van het bariumzout van furfurolcarbonzuur-5 zou kunnen wijzen. Dit laatste heeft immers een bariumgehalte van 33,1%, in tegenstelling met bariumgalacturonaat, dat 26.3% barium bezit.

TABEL IX.

Bariumgehalte van de, uit 5%-ige waterige bariumgalacturonaatoplossing met waterdamp onder druk verkregen, preparaten (gemiddelden van twee bepalingen)				
Uitgangproduct	Duur der behandeling in min.	Temp. in °C.	Aanduiding van verkregen preparaat	% Ba
5% Ba. gal. opl.	150	110	preparaat 1	27.3
„ „	180	125	„ 2	34.4
„ „	210	138	„ 3	36.4
7% „	30	181	„ 4	40.8
5% „	90	180	„ 5	42.6

Uit deze tabel blijkt, dat bij de inwerking van oververhitte stoom op bariumgalacturonaat het bariumgehalte snel stijgt en dat deze stijging afhankelijk is van de temperatuur en de duur der behandeling.

Indien de stijging van het bariumgehalte aan de aanwezigheid van furfurolcarbonzuur-5 toe te schrijven zou zijn, zouden deze

preparaten bij koken met 12%-ig zoutzuur meer furfurol geven dan *gelijke* gewichtshoeveelheden bariungalacturonaat. Ten einde dit na te gaan, werden de producten met 12%-ig zoutzuur gekookt en het gevormde furfurol als phloroglucide gewogen (zie tabel X).

TABEL X.

Furfurolbepalingen van bariungalacturonaat en van de, met waterdamp onder druk uit bariungalacturonaat verkregen, preparaten				
Preparaat	% Ba	Gewicht in mg	Furfurolphloroglucide	
			gevonden in mg	omgerekend op 300 mg stof
Bariungalacturonaat	26.65	279.9	70.1	75.0
Preparaat 1 (tabel IX)	27.3	295.5	69.6	70.5
„ 1 „		303.4	71.2	
„ 2 „	34.4	300.5	18.2	18.1
„ 2 „		301.5	18.1	
„ 3 „	36.4	303.2	3.5	3.4
„ 3 „		300.1	3.5	
„ 4 „	40.8	300.1	0	0

Hieruit blijkt dus, dat de hoeveelheid furfurol, die bij koken met 12%-ig zoutzuur gevormd wordt, afneemt bij preparaten met toenemend bariumgehalte.

Zelfs uit preparaat 1 ontstaat minder furfurolphloroglucide dan uit bariungalacturonaat.

Hieruit volgt, dat de, op boven beschreven wijze verkregen, preparaten geen belangrijke hoeveelheden bariumzout van furfurolcarbonzuur-5 bevatten.

Het uit de preparaten nog gevormde furfurol is zeer waarschijnlijk afkomstig van ontleed galacturonzuur, daar de preparaten 1 en 2 een duidelijke, preparaat 3 een nog juist waarneembare, doch preparaat 4 geen naphtoresorcine-reactie meer geven.

Uit deze resultaten volgt, dat de sub 3 genoemde mogelijkheid voor de furfurolvorming onwaarschijnlijk is. Wel werd met deze proeven het bewijs geleverd, dat er een of meerdere nevenproducten kunnen ontstaan, doch deze geven bij de inwerking van mineraalzuren geen furfurol.

§ 5 De vierde en de vijfde mogelijkheid.

De onder 3 beschreven resultaten maken ook de onderstellingen 4 en 5 voor de furfurolvorming onwaarschijnlijk. Ook wanneer de reactie onder afsplitsing van 1 of 2 moleculen water verloopt, zijn tussenproducten te verwachten, die bij koken met mineraalzuren meer furfurol geven, dan een gelijke hoeveelheid uronzuur. Er werden echter slechts producten verkregen, die minder furfurol gaven.

De koolzuurvorming.

§ 6. Het verloop der koolzuurvorming uit de uronzuren.

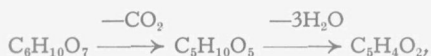
Het, bij de decarboxyleering van uronzuren bij koken met minerale zuren gevormde, koolzuur ontstaat voor *een gedeelte* volgens het schema:



Een ander gedeelte van het koolzuur ontstaat echter volgens een ander reactieschema. De volgende overwegingen maken dit reeds waarschijnlijk:

1e. Bij de kwantitatieve *furfurolbepaling* (3) (door 300 mg uronzuur met 12%-ig zoutzuur te koken) duurt het afdestilleeren van furfurol $1\frac{1}{2}$ tot 2 uren. Bij de kwantitatieve *koolzuurbepaling* (onder analoge omstandigheden) duurt de koolzuurafsplitsing ongeveer 5 uren (44, 54, 80, 230). Hieruit volgt, dat na 2 uren koken met 12%-ig zoutzuur een product gevormd is, dat weliswaar geen furfurol meer geeft, maar nog wel koolzuur afsplitst.

2e. De furfurolopbrengst uit een uronzuur is veel geringer dan uit een aequivalente hoeveelheid pentose. Indien de reactie over de pentose verloopt volgens het schema:



zouden uit 300 mg galacturonzuur 232 mg arabinose, dus 206 mg furfurolphloroglucide (81) ontstaan. Er ontstaat echter slechts 100 mg furfurolphloroglucide (133, 229).

Het bleek ons nu, dat de bariumpreparaten, die uit bariumgalacturonaat verkregen waren door deze met oververhitte stoom in een autoclaaf te verhitten (zie hierboven), bij koken met minerale zuren nog wel koolzuur afsplitsten, doch geen furfurol gaven. Dit gedrag

stemt overeen met dat van de, bij koken van uronzuren met minerale zuren gevormde, tusschenproducten, die eveneens nog wel koolzuur afsplitsen, doch geen furfurol meer geven. Het lag dus voor de hand, om in de eerste plaats de samenstelling van de bariumpreparaten na te gaan.

§ 7. **Onderzoek van de, uit bariumuronaten met waterdamp onder druk verkregen, bariumhoudende preparaten.**

De bariumpreparaten van tabel IX bezitten de volgende eigenschappen:

- 1e. Zij geven geen der kleurreacties van furfurol en zijn derivaten.
- 2e. Zij reduceeren FEHLING's proefvocht in de koude.
- 3e. Zij ontkleuren kaliumpermanganaat in de koude.
- 4e. Zij ontkleuren een jood-joodkaliumoplossing in de koude.

F. EHRLICH, F. SCHUBERT (54), K. P. LINK en C. NIEMANN (141) vonden bij inwerking van minerale zuren op galacturonzuur een, FEHLING's proefvocht in de koude reduceerende, stof, die niet nader onderzocht werd, doch met het hier beschreven product waarschijnlijk nauw verwant is.¹⁾ Ook onzuiver bariumgalacturonaat en bariumglucuronaat, zooals wij het bij de bereiding uit resp. citroenpectine en arabische gom verkregen, reduceerden FEHLING's proefvocht een weinig in de koude; deze ruwe bariumzouten bevatten waarschijnlijk dezelfde stof.

Voor de identificatie heeft de volgende beschouwing ons tot een oplossing geleid. Er bestaat een zekere analogie tusschen de reacties:



Uit ω -oxymethylfurfurol ontstaat verder bij inwerking van zuren, onder afsplitsing van mierenzuur, laevulinezuur (6, 46, 117, 195, 197), volgens de vergelijking:



Deze reactie verloopt bijna kwantitatief, zoodat oxymethylfurfurol nog slechts in sporen aan te toonen is.

In analogie hiermede zou het mogelijk zijn, dat bij een behandeling van bariumgalacturonaat met waterdamp onder druk aanvankelijk het bariumzout van furfurolcarbonzuur-5 ontstaat, dat onbestendig is en

¹⁾ Zie noot op pag. 139.

onder mierenzuurafplitsing in pentanon-4-al-5 zuur overgaat, volgens de vergelijking:



Verder bestaat er onder deze omstandigheden nog de mogelijkheid, dat het pentanon-4-al-5-zuur verder gehydrolyseerd wordt in mierenzuur en barnsteenaldehydezuur, volgens het schema:



Beide verbindingen, het pentanon-4-al-5-zuur en het barnsteen-aldehydezuur, zullen bij oxydatie barnsteenzuur geven.

Inderdaad gelukte het ons om barnsteenzuur onder de oxydatie-producten van de, met waterdamp onder druk uit bariungalacturonaat verkregen, preparaten aan te toonen.

Aan 2100 mg, in water opgelost, bariumzout (preparaat 2, tabel IX) werd ondermaat zwavelzuur (19 cm³ 2.01%-ig) toegevoegd. Het filtraat, dat nog een weinig barium bevatte, werd aangezuurd met azijnzuur en vervolgens met overmaat kaliumpermanganaat behandeld. Nadat de oplossing 4 uren bij kamertemperatuur gestaan had, werd de overmaat met mierenzuur weggenomen. Nadat met noriet ontkleurd was, werd de oplossing op het waterbad tot 15 cm³ ingedampt. Hieraan werden 30 cm³ 2-n zoutzuur toegevoegd, waarna de oplossing verschillende malen met aether uitgetrokken werd. Deze aether-oplossing werd op het waterbad afgedestilleerd, waarna het residu in vacuüm boven geconcentreerd zwavelzuur en calciumoxyde gedroogd werd. Er kristalliseerde een stof uit, die opnieuw met aether uitgetrokken werd. Dit aether-extract werd weer op het waterbad verdampt en het residu in een vacuümexsicicator boven zwavelzuur en calciumoxyde gedroogd. Smpt. der uitgekristalliseerde stof: 162° C.

Na sublimatie bleek het smeltpunt 181 °C. te zijn (volgens de literatuur is het smeltpunt van barnsteenzuur: 183° C.). Het sublimaat werd met ammoniak geneutraliseerd en het barnsteenzuur microchemisch met loodacetaat aangetoond (15). Het loodzout kristalliseerde in heldere, kleine ruitjes.

Bij een tweede proef werden 7.5 g bariungalacturonaat gedurende 2 uren op 150° C. met 130 cm³ water en 10 g bariumcarbonaat verhit. Het uit deze oplossing met alcohol neergeslagen bariumzout gaf eveneens bij oxydatie (uitvoering als op p. 137) barnsteenzuur (Smpt.: 177° C.). Met loodacetaat werden de ruitjes van loodsuccinaat verkregen.

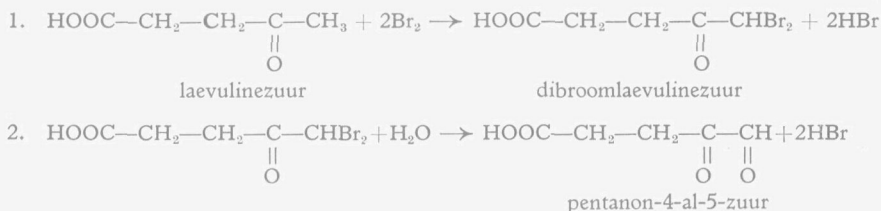
Het ontstaan van pentanon-4-al-5-zuur, of van barnsteenaldehydezuur, bij verhitting van bariungalacturonaat met waterdamp onder druk verklaart eveneens de bovengenoemde eigenschappen van de ruwe bariumzouten, daar van deze beide stoffen wel sterke reductiewerking, maar geen furfuolreacties te verwachten zijn.

Ook de bariumberichten dezer preparaten zijn, voor zoover zij vrij van bariumbergalacturonaat zijn (dit geldt nog juist niet voor preparaat 3, maar wel voor preparaat 4), in overeenstemming met de onderstelling, dat deze preparaten een groot percentage aan bariumberzouten van pentanon-4-al-5-zuur, of van barnsteenaldehydezuur, bevatten.

De zouten van deze laatste zuren bevatten resp. 34.7 en 40.5% bariumber en de preparaten 3 en 4 resp. 36.4 en 40.8% bariumber.

Ter volledige identificatie werd het pentanon-4-al-5-zuur synthetisch uit laevulinezuur bereid en zijn reacties vergeleken met die der preparaten, bedoeld in tabel IX.

Bereiding van pentanon-4-al-5-zuur. L. WOLFF (271, 272) is de eerste, die het pentanon-4-al-5-zuur synthetisch bereid heeft; hij duidde dit zuur als methylglyoxalylazijnzuur aan. Als uitgangsmateriaal nam hij laevulinezuur, waaruit het dibroomlaevulinezuur door bromering bereid werd. Dit dibroomlaevulinezuur splitst bij koken met water gemakkelijk broomwaterstof af en gaat daarbij in pentanon-4-al-5-zuur over. Het zuur kan niet kristallijn, doch slechts als stroop, verkregen worden. De hierbij plaats grijpende reacties kunnen door het volgende schema weergegeven worden:



15 g laevulinezuur werden in 45 g chloroform opgelost. Hierbij lieten wij onder goed roeren uit een buret 45 g broom, met 15 g chloroform gemengd, druppelen. De eerste druppels broom werden langzaam ontleurd. Toen de reactie eenmaal begonnen was, verliep zij snel onder broomwaterstofontwikkeling. Na toevoeging van alle broom werd de chloroform in vacuüm afgedampt. Er bleef een witte kristallijne massa achter, die uit een mengsel van ligroïne en aether omgekristalliseerd werd. Opbrengst aan dibroomlaevulinezuur: 25 g. Smpt.: 114° C.

Vervolgens werden 20 g dibroomlaevulinezuur in een rondkolfje met terugvloeiakoeler met 200 cm³ water op een zandbad gedurende 6 uren gekookt. De kleur der oplossing werd bruinrood. Daarna werd 20 g zilverbicarbonaat in de oplossing gesuspenderd en het neerslag afgefiltreerd. Het opgeloste zilver werd door voorzichtige toevoeging van zwavelwaterstofwater verwijderd. Het filtraat werd in vacuüm ingedampt, waarbij het pentanon-4-al-5-zuur als *stroop* verkregen werd.

Een gedeelte van het pentanon-4-al-5-zuur werd op het bariumzout verwerkt. Dit geschiedde door een oplossing van pentanon-4-al-5-zuur in water met bariumcarbonaat te neutraliseeren en het zoo verkregen bariumzout met alcohol te precipiteeren.

S. VEIBEL (261) heeft een methode aangegeven om het pentanon-4-al-5-zuur kwalitatief af te scheiden. Hij heeft het para-nitrophenylhydrazon van dit zuur kristallijn verkregen (smpt.: 271° C.). Dit is mij echter niet gelukt. Noch het synthetische pentanon-4-al-5-zuur, noch het ontlede galacturonzuur gaven een gekristalliseerd nitrophenylhydrazon.

Vóórdien toonde C. NEUBERG het pentanon-4-al-5-zuur met p-nitrophenylhydrazine, in 50%-ig azijnzuur opgelost, aan. Er wordt bij gewone temperatuur een rood neerslag gevormd. Deze reactie kon ook door ons zoowel met het synthetische pentanon-4-al-5-zuur, als met het door ontleding van galacturonzuur verkregen zuur, gemakkelijk verkregen worden.

Wij zullen hier de verschillende reacties, die pentanon-4-al-5-zuur en het door verhitting van galacturonzuur gevormde product met phenylhydrazine, met p-nitrophenylhydrazine en met FEHLING'S proefvocht geven, nagaan.

Behalve van deze producten zijn deze reacties eveneens van de volgende stoffen nagegaan:

1e. Galacturonzuur en mannuronzuurlacton.

2e. Het product, dat verkregen werd door bariummannuronaat met stoom onder druk te verhitten. De bereiding was analoog aan die van preparaat 3, tabel IX.

3e. De ontledingsproducten, die bij 30 minuten koken van een bariumgalacturonaatoplossing en van een bariummannuronaatoplossing met 18%-ig zoutzuur werden gevormd. Volgens onze theoretische beschouwing zou hierbij namelijk hetzelfde ontledingsproduct gevormd zijn, als bij de ontleding der bariumuronaten met waterdamp onder druk.

Alvorens de resultaten in een tabel samen te vatten, geven wij de wijze, waarop de reacties werden uitgevoerd, weer.

De reactie met p-nitrophenylhydrazine werd als volgt uitgevoerd:

Aan, in weinig water opgelost, zuur of bariumzout werd bij *gewone* temperatuur para-nitrophenylhydrazine, dat in 50%-ig azijnzuur opgelost was, toegevoegd.

In het geval van de ontleding van uronzuur met 18%-ig zoutzuur, werd bovendien veel natriumacetaat toegevoegd.

Bij de reactie met phenylhydrazine werd de volgende werkwijze gevolgd:

Aan het, in water opgeloste, zuur of bariumzout werd zoutzure phenylhydrazine en natriumacetaat toegevoegd. De reactie had bij gewone temperatuur plaats. Ook hier werd, in het geval, dat de ontleding met 18%-ig zoutzuur had plaats gehad, veel natriumacetaat toegevoegd.

TABEL XI.

Reacties van uronzuren, van ontledingsproducten van uronzuren en van pentanon-4-al-5-zuur met phenylhydrazine, met p-nitrophenylhydrazine en met FEHLING's proefvocht			
Preparaat	P-nitrophenylhydrazine	Phenylhydrazine	FEHLING's proefvocht bij gewone temperatuur
Pentanon-4-al-5-zuur	oranjerood p.p.	oranjerood p.p.	reductie
Bariumzout van pentanon-4-al-5-zuur	oranjerood p.p.	oranjerood p.p.	reductie
Gekr. mannuronzuurlacton	lichtgeel		
Bariummannuronaat (a)	kristallijn p.p. weinig oranjerood p.p.	geen neerslag geen neerslag	geen reductie geen reductie
Ontledingsproduct van (a) (18%-ige HCl-behandeling)	veel oranjerood p.p.		
Bariumgalacturonaat (b)		oranjerood p.p. geen neerslag	geen reductie
Ontledingsproduct van (b) (verhitting)	rood p.p.	bruin p.p.	reductie
Ontledingsproduct van (b) (18%-ige HCl-behandeling)	oranjerood p.p.	oranjerood p.p.	

Hierbij beschrijven wij nog twee bijzonderheden der reacties, die in de tabel niet voldoende weergegeven kunnen worden.

1e. Gekristalliseerd mannuronzuurlacton gaf met p-nitrophenylhydrazine een kristallijn neerslag, dat uit vlakke, dunne kristallen bestond, die lichtgeel gekleurd waren. De bovenstaande, lichtgeel gekleurde, vloeistof werd *langzamerhand rood* gekleurd.

2e. Deze reactie werd eveneens met moederloog van het mannuronzuurlacton (uit bariummannuronaat bereid, zie hoofdstuk VIII) uitgevoerd. Deze geeft met p-nitrophenylhydrazine, behalve een weinig kristallijn precipitaat, *veel oranjerood gekleurd* neerslag. De bovenstaande vloeistof was, in tegenstelling met die, welke in het voorafgaande geval werd beschreven, *onmiddellijk rood*.

Hieruit blijkt dus, dat zowel de producten, verkregen door verhitting van uronzuren, als die, verkregen door ontleding der uronzuren met een mineraalzuur, dezelfde reacties geven als pentanon-4-al-5-zuur.

Vooral de reactie met phenylhydrazine is belangrijk, omdat daaruit volgt, dat deze producten zeer waarschijnlijk, evenals pentanon-4-al-5-zuur, twee carbonylgroepen naast elkaar bezitten. Immers, verreweg de meeste hydrazonen zijn oplosbaar, de osazonen daarentegen onoplosbaar in water. Nu is de reactie met phenylhydrazine bij kamertemperatuur uitgevoerd.

Behalve de reacties op de carbonylgroep, zijn eveneens reacties op de carboxylgroep uitgevoerd en wel met metaalionen, met alkaloiden en met organische basen. Deze reacties staan in de hoofdstukken XIV en XV beschreven.

Ook daar zal blijken, dat zowel de producten, verkregen bij de ontleding van bariumgalacturonaat met stoom onder druk, als de producten, verkregen door de bariururonaten met 18%-ig zoutzuur te koken, dezelfde reacties geven als het pentanon-4-al-5-zuur, zoodat het aan geen twijfel onderhevig is, of de genoemde bariuronzouten zijn identiek met het bariuronzout van pentanon-4-al-5-zuur.

Dit houdt vanzelfsprekend niet in, dat bij de ontleding *uitsluitend* dit bariuronzout gevormd zou worden.

§ 8. Vorming van mierenzuur bij verhitting van bariuronalacturonaat met waterdamp onder druk.

Indien onze opvatting, dat bij de verhitting van bariuronalacturonaat met stoom onder druk pentanon-4-al-5-zuur ontstaat, juist is, zal de vorming van dit zuur uit galacturonzuur onder mierenzuurafplitsing plaats vinden.

Inderdaad kon deze mierenzuurafplitsing op de volgende wijze aangetoond worden:

Een oplossing van 7.5 g bariuronalacturonaat in 150 cm³ water werd in tegenwoordigheid van 10 g bariurcarbonaat (om eventueel gevormd mierenzuur te binden) gedurende 2 uren in een autoclaaf op 150° C. verhit. Nadat de overmaat bariurcarbonaat afgefilterd was, werden 20 cm³ 2-n zwavelzuur toegevoegd. Na filtratie werd het filtraat overgedestilleerd. Het destillaat reageerde sterk zuur. Na neutralisatie van dit destillaat met loog, werd het op het waterbad ingedampt. In de aldus verkregen oplossing werd mierenzuur microchemisch met ceriumnitraat aangetoond (15). Het ceriumformiaat kristalliseerde uit in pentagoondodecaëders en kogelvormige aggregaten, die tusschen gekruiste nicols een polarisatiekruis te zien gaven.

§ 9. Vorming van een tusschenproduct bij de ontleding van galacturonzuur met verdund zwavelzuur.

H. THIERFELDER (249) heeft in 1887 verkondigd, dat bij behandeling van glucuronzuur met 3%-ig zoutzuur een reduceerend, in aether

oplosbaar, in kristallijne toestand te verkrijgen, zuur zou ontstaan van de samenstelling $C_5H_6O_3$ (smpt.: $197^\circ C.$). NEUBERG (15) onderstelde, dat dit zuur een hydrofuraanderivaat was.

Bij de ontleding van galacturonzuur met zwavelzuur konden wij in de reactievloeistof hetzelfde tusschenproduct aantoonen, als bij de verhitting van bariungalacturonaat met stoom onder druk. Bij onze werkwijze werd dus niet het tusschenproduct gevormd, dat THIERFELDER isoleerde.

7.5 g bariungalacturonaat werden met 150 cm^3 20%-ig zwavelzuur in een rondkolf met terugvloeikoeler gedurende 2 uren gekookt. Nadat de reactievloeistof met noriet ontleurd was, werd de oplossing met bariumcarbonaat geneutraliseerd en vervolgens werd het filtraat in vacuüm ingedampt. Nadat nogmaals met noriet ontleurd was, werd de oplossing langzaam in 96%-ige alcohol gedruppeld, waarbij het bariumzout neersloeg. Dit bariumzout werd, na filtreren, met absolute alcohol en droge aether gewassen en daarna in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd. Het bariumzout bevatte 26.5% Ba.

Bij oxydatie van dit geïsoleerde tusschenproduct verkregen wij barnsteenzuur.

Aan 1530 mg bariumzout werden 40 cm^3 1.25%-ig zwavelzuur toegevoegd, waarna het gevormde neerslag afgefiltreerd werd. Het filtraat werd vervolgens gedurende 3 uren met overmaat kaliumpermanganaat bij gewone temperatuur behandeld. De overmaat kaliumpermanganaat werd door voorzichtige toevoeging van mierenzuur weggenomen. Na filtratie werden 2 g, in weinig water opgelost, bariumchloride toegevoegd, ten einde de oplossing vrij van zwavelzuur te maken.

De gefiltreerde oplossing werd eenige malen ($5 \times$) met aether geëxtraheerd, waarna het aether-extract, nadat het oplosmiddel afgedestilleerd was, in vacuüm boven zwavelzuur gedroogd werd. Het residu werd nogmaals met aether uitgetrokken. Na herhaling van de hierboven beschreven behandeling der aether-oplossing werden goed sublimeerbare kristallen verkregen. De kristallen reageerden zuur en gaven, na neutralisatie met ammoniak, een gekristalliseerd, met loodsuccinaat identiek loodzout.

§ 10. De kwantitatieve bepaling van de hoeveelheid koolzuur, gevormd uit de uronzuren.

Bij de inwerking van 12%-ig zoutzuur op een uronzuur bij kooktemperatuur ontstaat *in de eerste uren* het meeste koolzuur volgens het schema:



Het niet volgens deze vergelijking ontlede uronzuur wordt terzelfdertijd als volgt ontleed:



Misschien gaat deze ontleding nog tot barnsteenaldehydezuur verder.

In de volgende uren wordt het, door de zuurinwerking gevormde, pentanonalzuur gedecarboxyleerd.

Onder deze omstandigheden is bij de kwantitatieve koolzuurbepaling uit uronzuur de theoretische hoeveelheid koolzuur nauwelijks te verwachten en zij wordt, zooals bekend is, in werkelijkheid dan ook niet heelemaal bereikt (230).

Samenvatting.

1e. De furfurolvorming uit de uronzuren verloopt ten deele over de bijbehorende pentose.

Bij de reactie overweegt echter de gelijktijdige koolzuur- en waterafsplitsing, die misschien zóó is op te vatten, dat de intermediair gevormde pentosen gemakkelijk water afsplitsen.

2e. Bij de behandeling van bariumgalacturonaat en bariummannuronaat met waterdamp onder druk ontstaat een stof, die bij oxydatie barnsteenzuur geeft en ook alle verdere reacties met het, synthetisch uit laevulinezuur bereide, pentanon-4-al-5-zuur gemeen heeft.

3e. Bij de behandeling van galacturonzuur en mannuronzuur met minerale zuren bij kooktemperatuur, verloopt de koolzuurafsplitsing ten deele onder gelijktijdige furfurolvorming, ten deele echter zonder deze en onder vorming van pentanon-4-al-5-zuur als tussenproduct.

NOOT.

¹⁾ Van T. REICHSTEIN en R. OPPENAUER verscheen einde 1933 een publicatie over het ontledingsproduct, dat bij de inwerking van minerale zuren op galacturonzuur wordt gevormd.

Zij hebben gevonden, dat het ontledingsproduct bij oxydatie met kaliumpermanganaat barnsteenzuur gaf en dat met phenylhydrazine bij kamertemperatuur een onoplosbare verbinding werd gevormd.

Deze eigenschappen hebben wij reeds lang vóór dien geconstateerd en gepubliceerd.

Ten onrechte onderstellen zij, dat het gevormde ontledingsproduct de volgende constitutie zou bezitten: $\text{CH}_2\text{—COH=COH—CO}$



T. REICHSTEIN en R. OPPENAUER, *Helv. Chim. Acta*, 16-988-1933.

HOOFDSTUK XIV.

Reacties op de carboxylgroep van uronzuren en van enkele verwante zuren.

§ 1. Inleidende opmerkingen.

Tot dit onderzoek zijn wij gekomen door de omstandigheid, dat er tot nu toe geen karakteristieke eenvoudig uit te voeren, reacties op de verschillende uronzuren bestaan.

Het is zeer gewenscht, dat wij op de uronzuren reacties kennen, die een identificatie der verschillende uronzuren mogelijk maken, daar de uronzuren zeer verbreid in de natuur voorkomen. Behalve in eenige uitzonderingsgevallen worden zij echter niet in vrije toestand, doch steeds als condensatieproducten met suikers of niet-suikers, in de natuur aangetroffen. Het gebonden voorkomen der uronzuren maakt hun opsporing veel moeilijker, daar bij de gebruikelijke wijze van isoleering een belangrijk gedeelte van het uronzuur verloren gaat. Deze isoleering geschiedt door hydrolyse met minerale zuren. Bij deze hydrolyse wordt steeds een groot gedeelte der uronzuren door decarboxyleering ontleed. Zoo wordt, zooals reeds hiervóór opgemerkt is, bij de bereiding van glucuronzuur uit arabische gom ongeveer 60% van het glucuronzuur omgezet.

Behalve het hier beschreven bezwaar, dat wij veel minder uronzuur uit een natuurlijk product kunnen isoleeren dan daarin voorkomt, bestaat er nog een tweede moeilijkheid, n.l. om de uronzuren in zuivere toestand te verkrijgen. De zuren zijn namelijk uit de onzuivere oplossingen, zooals wij die bij de bereiding verkrijgen, moeilijk kristallijn af te scheiden, zoodat een identificatie aan het smeltpunt en andere physische constanten dikwijls onmogelijk is.

In de literatuur worden vele gevallen beschreven, waarin de aanwezigheid van een uronzuur bewezen is, doch een identificatie daarvan niet gelukte.

In een uitvoerig overzicht over de biochemie van pectine en galacturonzuur trekt F. EHRLICH (57) dan ook in sommige gevallen het beweerde voorkomen van uronzuren in hemicellulosen en in andere celwandbestanddeelen in twijfel.

In vele gevallen werd tot de aanwezigheid van een bepaald uronzuur besloten door het zuur te oxydeeren en het gevormde oxydatieproduct te identificeren. Aan een dergelijke identificatie zijn verschillende bezwaren verbonden. In de eerste plaats kunnen er, bij onzuivere producten, nog suikers aanwezig zijn, die tot analoge producten als de uronzuren geoxydeerd worden, waardoor vergissingen mogelijk zijn. In de tweede plaats kan zulk een oxydatieproduct van 2 verschillende uronzuren afgeleid zijn. Zoo ontstaat, zoowel uit guluronzuur als uit glucuronzuur, bij oxydatie: suikerzuur.

Ook naar aanleiding van de hier vermelde moeilijkheden bij de identificatie der uronzuren was het dus gewenscht een nader onderzoek naar de reacties der uronzuren in te stellen.

De door ons op hun microchemische reacties onderzochte uronzuren en verwante zuren zijn: glucuronzuur, galacturonzuur, mannuronzuur, ascorbinezuur (vitamine C)¹⁾, het synthetisch bereide pentanon-4-al-5-zuur, het door ontleding der uronzuren verkregen pentanon-4-al-5-zuur en het gluconzuur.

Wij kunnen dus, zoowel op de carboxylgroep als op de carbonylgroep, reageeren en wij hebben in de eerste plaats getracht daardoor tot kristallijne verbindingen te komen. Bovendien hebben wij dan nog nagegaan, welke kleurreacties de zuren vertoonen.

Wij zullen in de volgende paragrafen de reacties op de carboxylgroep bespreken. Daartoe werd op de genoemde zuren gereageerd met: 1e. metaalionen; hierbij is ook de mogelijkheid tot vorming van complexe verbindingen nagegaan; 2e. alkaloiden; 3e. eenige andere organische basen.

De *gewone* reacties met de metaalionen op de uronzuren en op het ascorbinezuur leverden, op eenige uitzonderingen na, geen nieuwe gezichtspunten op. EHRlich, HAWORTH, SZENT-GYÖRGYI en anderen hebben dit gebied reeds bewerkt.

Nieuw zijn de reacties met cinchonidine op glucuronzuur, met brucine op galacturonzuur en met uranyl-nitrat op ascorbinezuur. Voor zoover ons bekend, zijn verder de reacties met metaalionen op pentanonalzuur en de reacties, waarbij complexe verbindingen uit de verschillende zuren gevormd worden, eveneens nieuw.

¹⁾ Toentertijd hadden wij het ascorbinezuur nog niet bereid en werden de reacties uitgevoerd met ascorbinezuur, dat Prof. A. SZENT GYÖRGYI te Szeged (Hongarije) ons verstrekt had.

Reacties van de uronzuren en enkele + = precipitaat — = heldere oplossing			
Reagens	15%-ige Ammoniumzoutoplossingen		
	glucuronzuur	galacturonzuur	mannuronzuur
<i>Eerste groep</i>			
Lithiumchloride	—	—	—
Natriumchloride	—	—	—
Kaliumchloride	—	—	—
Rubidiumchloride	—	—	—
Caesiumchloride	—	—	—
Cuprochloride	—	—	—
Cuprichloride	—	—	—
Zilvernitraat	—	—	—
<i>Tweede groep</i>			
Berylliumsulfaat	—	—	—
Magnesiumnitraat	—	—	—
Calciumnitraat	—	—	—
Strontiumnitraat	—	—	—
Bariumnitraat	—	—	—
Zinksulfaat	—	—	—
Cadmiumchloride	—	—	—
Mercuronitraat	—	—	—
Mercurinitraat	—	—	—
<i>Derde groep</i>			
Aluminiumnitraat	—	—	—
<i>Vierde groep</i>			
Zirconiumnitraat	—	—	—
Thoriumnitraat	—	—	—
Tinchloride	—	—	—
Loodnitraat	—	—	—
Bas. loodacetaat	+	+	+
<i>Zesde groep</i>			
Chroomaluin	—	—	—
Uranyl nitraat	—	—	—
Molybdeenchloride	—	—	—
<i>Zevende groep</i>			
Mangaansulfaat	—	—	—
<i>Achtste groep</i>			
Ferrosulfaat	—	—	—
Ferrisulfaat	—	—	—
Cobaltchloride	—	—	—
Nikkelsulfaat	—	—	—
<i>Zeldzame Aarden</i>			
Ceriumnitraat	—	—	—
Lanthaniumnitraat	—	—	—
Neodymiumchloride	—	—	—
Praeseodymiumnitraat	—	—	—
Samariumsulfaat	—	—	—
Yttriumnitraat	—	—	—
Erbiumnitraat	—	—	—
Ytterbiumnitraat	—	—	—

§ 2. Reacties der metalen met uronzuren en met enkele verwante zuren.

Voor deze proeven werd uitgegaan van 15%-ige oplossingen van de ammoniumzouten der te onderzoeken zuren. Deze oplossingen werden bereid door gekristalliseerd zuur (uronzuren en vitamine C) of stroop (pentanonalzuur en gluconzuur) in een bepaalde hoeveelheid water op te lossen en deze oplossingen met ammoniak te neutraliseeren. In een druppel van deze oplossingen werd met een metaalzoutoplossing op de zuren gereageerd.

Alvorens tot een afzonderlijke bespreking over te gaan, geven wij de resultaten in tabelvorm weer (zie tabel XII).

Zooals uit de tabel blijkt, geven de ammoniumzoutoplossingen der *uronzuren* uitsluitend een precipitaat met basisch loodacetaat. Er ontstond bij toevoeging van een druppel basisch loodacetaat aan een druppel van een 15%-ige ammoniumuronaatoplossing een wit amorf neerslag. Bij verhitting van het amorphe product, uit glucuronzuur verkregen, werd de kleur van het neerslag bruin. Dit is eveneens het geval met het precipitaat, dat uit mannuronzuur met basisch loodacetaat gevormd werd. Bij verhitting van het precipitaat, dat uit ammoniumgalacturonaat en basisch loodacetaat of loodazijn was gevormd, werd de kleur rood. Deze laatste reactie is door F. EHRlich (58) ontdekt en hij beveelt deze reactie aan om het galacturonzuur kwalitatief aan te toonen. De reactie vertoont veel overeenkomst met de reactie van M. RUBNER (209) op de suikers met loodhydroxyde.

Het product, dat bij hydrolyse van *fucoïdinezuur* gevormd werd, gaf, zooals reeds opgemerkt is, eveneens met basisch loodacetaat een neerslag, dat bij verhitting bruin werd.

Het ammoniumzout van *gluconzuur* gaf in 15%-ige waterige oplossing met geen der metaalzouten een reactie.

De ammoniumzoutoplossing van *ascorbinezuur* gaf precipitaten met cuprochloride, cuprichloride, mercuronitrat, mercurinitrat, tinchloride en basisch loodacetaat.

De ascorbinaatoplossing gaf zoowel met cupro- als met cuprichloride, bij gewone temperatuur, een wit precipitaat. Bij verhitting werd de kleur van het precipitaat rood. Deze reactie is aan reductie te wijten.

Het ammoniumascorbinaat gaf met zilvernitraat bij gewone temperatuur een zwart neerslag. Het zilvernitraat wordt dus reeds in neutrale oplossing, bij normale temperatuur, door vitamine C gereduceerd.

Met mercurio- en mercurinitraat gaf een ammoniumascorbinaat-oplossing bij kamertemperatuur een amorf, zwart precipitaat.

Het ammoniumascorbinaat gaf met tinchloride een wit, amorf precipitaat.

Ook met basisch loodacetaat gaf het vitamine C een wit, amorf neerslag. Bij verhitting loste het neerslag op en kwam bij afkoeling als kleine, ongekleurde bolletjes te voorschijn. De bolletjes zijn waarschijnlijk niet kristallijn, daar zij tusschen gekruiste nicols niet oplichten.

Het vitamine C vertoont in dit opzicht een geheel ander gedrag dan de uronzuren, waarbij het amorfe loodprecipitaat zich bij verhitting kleurt.

Het ammoniumascorbinaat gaf voorts *kleurreacties* met uranyl-nitraat, ferrosulfaat en ferrisulfaat.

Bij toevoeging van een kristal uranylnitraat aan een neutrale oplossing van ammoniumascorbinaat ontstond een bloedroode kleur.

Deze reactie is zeer gevoelig. Wij kregen de kleur nog bij zeer verdunde ammoniumascorbinaatoplossingen. Wij hebben de geschiktheid dezer reactie als kwalitatieve reactie op vitamine C onderzocht. Het veelvuldig voorkomen van vitamine C en de tegenwoordig talrijke onderzoeken, die daarover verricht worden, maken namelijk een specifieke reactie op de vitamine wenschelijk.

Het ascorbinezuur kan langs biologische weg kwalitatief aangetoond worden. Doch deze wijze van aantoonen is te omslachtig voor een algemeene toepassing.

Overigens bestaat er, behalve reductie-reacties met zilvernitraat, met kopersulfaat en met eenige kleurstoffen, geen reactie op het ascorbinezuur.

Bij het onderzoek der bloedroode kleurreactie bleek, dat de roode kleur in zuur milieu zeer verzwakt wordt, doch in neutraal of zwak alkalisch milieu weer te voorschijn komt.

Vervolgens werd nagegaan, of andere stoffen ook deze reactie met uranylnitraat geven. Organische zuren, zooals mierenzuur, azijnzuur, appelzuur, citroenzuur, wijnsteen zuur, de uronzuren,

pentanon-4-al-5-zuur en talrijke andere organische zuren deden de verkleuring niet optreden.

Daarentegen bleken looistoffen en phenol met uranylmetaat een roode kleur te geven. Aangezien de looistoffen in de planten voorkomen, kunnen wij dus niet zonder meer het ascorbinezuur in plantenproducten met uranylmetaat aantonen.

Ten einde dit bezwaar te ondervangen, hebben wij de volgende werkwijze toegepast, die zeer algemeen met plantenproducten gebezigd kan worden, om van de aanwezigheid van looistoffen geen bezwaren te ondervinden.

Aan het perssap van een sinaasappel werd overmaat looiacetaat toegevoegd en het mengsel met ammoniak, in tegenwoordigheid van de Universeelindicator (B. D. H.), geneutraliseerd tot $\text{pH} = 7$. Het gevormde neerslag, dat o.a. de looistoffen bevatte, werd afgefiltreerd. Vervolgens werd aan het filtraat ammoniak toegevoegd tot de broomthymolblauwindicator werd blauw gekleurd. Het gevormde neerslag bevatte het ascorbinezuur. Het zuur kon in dit neerslag aangetoond worden, door een weinig van het precipitaat in een druppel water en wat azijnzuur op te lossen en in deze druppel een kristal uranylmetaat te plaatsen. Rondom het kristal werd een roode kring gevormd, die zich langzamerhand uitbreidde.

Bij de gevolgde werkwijze is een vergissing met looistoffen uitgesloten, daar deze met looiacetaat uit de oplossing geprecipiteerd worden. Phenol wordt niet met looiacetaat uit haar oplossing geprecipiteerd. Phenol is echter slechts in enkele planten en dan nog in uiterst kleine hoeveelheden aangetoond. Wellicht zal het blijken, dat, na deze voorbereiding, de kleuring met uranylmetaat algemeen als reactie voor het ascorbinezuur toegepast kan worden.

Het ammoniumzout van ascorbinezuur gaf met ferrosulfaat een violette kleur, die langzamerhand donkerder werd. Met ferrisulfaat gaf het ammoniumascorbinaat een roodbruine kleur, die langzaam violet en tenslotte donker gekleurd werd.

De *ammoniumzoutoplossing van pentanon-4-al-5-zuur* gaf, zoals uit de tabel blijkt, met vele metaalzouten een precipitaat.

Cuprochloride en cuprichloride gaven beide met het ammoniumzout van pentanonalzuur een geelgroen, amorf precipitaat. Het bariumproduct uit ontleed bariumgalacturonaat gaf een bruin en het bariumproduct uit ontleed bariummannuronaat een groen precipitaat met de koperchloriden.

Met zilvernitraat gaf het ammoniumzout van pentanonalzuur een wit neerslag, dat bij verhitting bruin werd. Ook bij gewone temperatuur werd het witte neerslag langzamerhand bruin. Dit-

zelfde beeld gaven de bariumproducten uit ontlede bariumuronaten met zilvernitraat te zien.

Beschouwen wij thans de tweede groep van het periodiek systeem. Het ammoniumzout van pentanon-4-al-5-zuur gaf in water onoplosbare verbindingen met berylliumsulfaat, zinksulfaat, cadmiumchloride, mercuronitraat en mercurinitraat.

Berylliumsulfaat gaf met het ammoniumzout van pentanon-4-al-5-zuur een kristallijn precipitaat. Het precipitaat bestond uit fijne naaldjes, die tusschen gekruiste nicols oplichtten. Bij verwarming loste het neerslag op en kwam bij afkoeling grootendeels in amorfe toestand terug.

De ammoniumzouten van de ontledingsproducten uit galacturonzuur en mannuronzuur (de bariumzouten dezer zuren werden met ammoniumsulfaat in de ammoniumzouten omgezet) gaven met berylliumsulfaat een amorf neerslag. Dit verschil, tusschen het pentanonalzuur eenerzijds en de ontledingsproducten van galacturonzuur en mannuronzuur anderzijds, is zeer waarschijnlijk te wijten aan het feit, dat ook andere ontledingsproducten dan het pentanonalzuur bij de ontleding van de uronzuren gevormd worden.

Zinksulfaat en cadmiumchloride gaven zeer weinig precipitaat met het ammoniumzout van pentanonalzuur. De bariumzouten van de ontledingsproducten uit galacturonzuur en van mannuronzuur gaven een wit, amorf precipitaat met cadmiumchloride.

Het ammoniumzout van pentanonalzuur gaf, evenals de bariumzouten der ontledingsproducten van galacturonzuur en van mannuronzuur met mercurichloride een geelbruin, amorf precipitaat.

Met mercuronitraat gaven de drie stoffen eveneens een amorf neerslag.

In de derde groep gaf het aluminiumnitraat een reactie. Bij toevoegen van een druppel aluminiumnitraatoplossing aan een druppel ammoniumzoutoplossing van pentanonalzuur ontstond een geelbruin, amorf precipitaat, dat echter, bij roeren met een glazen staafje, weer oploste. De bariumzouten van de ontledingsproducten der uronzuren gaven geen neerslag met aluminiumnitraat.

Van de vijfde groep van het periodiek systeem gaven alle metalen, waarmee gereageerd werd, neerslagen met het ammoniumzout van pentanonalzuur en met de bariumzouten van de ontledingsproducten uit galacturonzuur en uit mannuronzuur.

Met zirconiumnitraat, thoriumnitraat, tinchloride, loodnitraat en basisch loodacetaat ontstonden bruine precipitaten.

Van de zesde groep gaven eveneens alle gebruikte metalen onoplosbare verbindingen met het ammoniumzout van pentanonalzuur en met de bariumzouten der ontledingsproducten van uronzuren.

Met chromaluin werd een geelbruin, amorf precipitaat, met uranyl-nitraat een bruin, amorf neerslag en met molybdeentrichloride werd een roodbruin, amorf precipitaat verkregen.

Van de zevende groep van het periodiek systeem werd met mangaan gereageerd, dat echter met geen der drie onderzochte ammoniumzouten een precipitaat gaf.

Van de achtste groep werd met cobalt, met nikkel en met ijzer als ferro- en ferrisulfaat gereageerd.

Met cobaltchloride gaven de oplossingen van elk der drie onderzochte zouten bij verhitting een weinig geelbruin, amorf neerslag. Met nikkelsulfaat werd geen onoplosbare verbinding gevormd. Met ferrosulfaat ontstond zeer weinig amorf precipitaat. Met ferrisulfaat daarentegen gaven de ammoniumzouten van pentanonalzuur en die van de ontledingsproducten van galacturonzuur en mannuronzuur een dik, blauwzwart, amorf precipitaat.

Met alle toegepaste elementen der *zeldzame aarden* gaven de ammoniumzouten van het pentanon-4-al-5-zuur en van de ontledingsproducten der uronzuren amorf, bruine precipitaten.

Deze resultaten sluiten elke twijfel aan het identiek zijn van het synthetisch bereide pentanon-4-al-5-zuur met het voornaamste ontledingsproduct van galacturonzuur en van mannuronzuur uit.

§ 3. Vorming van complexe verbindingen van uronzuren en van enkele verwante zuren met metalen.

Behalve het gedrag van de zuren met metaalzouten in neutraal milieu, werd onderzocht, of de uronzuren, gluconzuur, vitamine C en pentanon-4-al-5-zuur complexe verbindingen met de metalen kunnen vormen.

De genoemde zuren bleken inderdaad tot complexvorming in staat te zijn, waarvan wij hier het volgende voorbeeld geven.

Bij toevoeging van loog aan ferrisulfaat werd een bruinrood precipitaat van ferrihydroxyde gevormd. Het neerslag loste evenwel bij toevoeging van een der uronzuren, gluconzuur, vitamine C of

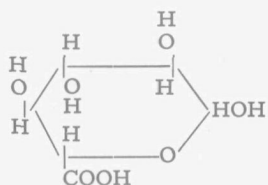
pentanonalzuur op, hoewel de oplossingen daarna nog sterk alkalisch reageerden.

Deze proef is het klassieke bewijs voor de mogelijkheid tot vorming van oplosbare complexe verbindingen. Ook met andere metalen bleken de zuren oplosbare complexe verbindingen te kunnen vormen. Om dit te beoordeelen, werd in een druppel van de oplossing van het zuur een weinig metaalzout gebracht en daarna werd een overmaat loog of ammoniak toegevoegd.

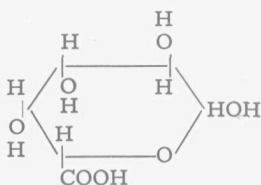
In tabel XIII hebben wij de resultaten dezer proeven vereenigd.

Beperken wij ons tot de door ons toegepaste metaalzouten, dan is de volgorde van de neiging tot complexvorming der verschillende zuren: 1^e. gluconzuur; 2^e. galacturonzuur; 3^e. mannuronzuur; 4^e. ascorbinezuur en 5^e. glucuronzuur en pentanon-4-al-5-zuur.

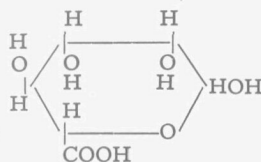
Dit resultaat zullen wij in verband met de structuurformule nader beschouwen. Daartoe geven wij eerst de constituties der zuren weer:



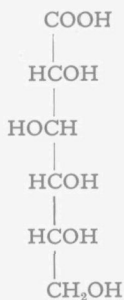
d-gluconzuur



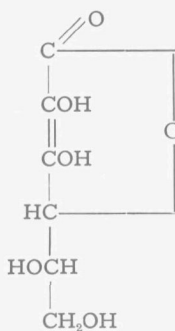
d-galacturonzuur



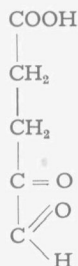
d-mannuronzuur



d-gluconzuur



ascorbinezuur



pentanon-4-al-5-zuur

TABEL XIII.

Reacties van uronzuren, gluconzuur, ascorbinezuur en pentanon-4-al-5-zuur met verschillende metaalzouten, in tegenwoordigheid van overmaat ammoniak of loog (p.p. beteekent precipitaat)						
Reagentia	Glucuronzuur	Galacturonzuur	Mannuronzuur	Gluconzuur	Ascorbinezuur	Pentanon-4-al-5-zuur
Ferrosulfaat + overmaat NH_3 + „ KOH	blauwgroen p.p. groen p.p.	groengele opl. blauwgroene opl.	groengele opl. weinig p.p.	groengele opl. groengele opl.	violette opl. groengeel p.p.	blauwgroen p.p. groen p.p.
Ferrisulfaat + overmaat NH_3 + „ KOH	weinig p.p. bruinroode opl.	bruinroode opl. bruinroode opl.	gele opl. bruinroode opl.	gele opl. gele opl.	violette opl. violette opl.	roodbruine opl. roodbruine opl.
Cobaltchloride + overmaat KOH	blauw p.p.	lichtroode opl.	groene opl.	lichtroode opl.	blauw p.p.	groen p.p.
Nikkelchloride + overmaat KOH	groen p.p.	groene opl.	groene opl.	groene opl.	weinig p.p.	bruin p.p.
Kopersulfaat + overmaat KOH	blauwe opl.	blauwe opl.	blauwe opl.	blauwe opl.	geelbruin p.p.	bruine opl.
Uranyl nitraat + overmaat NH_3 + „ KOH	geel p.p. weinig p.p.	geel p.p. gele opl.	geel p.p. gele opl.	weinig p.p. gele opl.	rood p.p. weinig p.p.	geel p.p. weinig p.p.

Uit de tabel blijkt, dat het pentanon-4-al-5-zuur, dat het kleinste aantal complexe verbindingen met metalen gaf, geen alcoholische hydroxylgroepen draagt.

De andere onderzochte zuren bezitten alle meer dan één alcoholische hydroxylgroep. Bij de vorming der complexe verbindingen spelen de hydroxylgroepen, zooals bekend is, dan ook een groote rol.

Het gluconzuur gaf de meeste oplosbare complexen. Dit was ook te verwachten, daar wij bij gluconzuur geen ringsluiting hebben, zooals dat bij de uronzuren het geval is.

Het galacturonzuur gaf, na gluconzuur, de meeste oplosbare complexe verbindingen met de verschillende metalen. Uit de formule blijkt, dat bij galacturonzuur de carboxylgroep aan het vijfde en de hydroxylgroep aan het vierde koolstofatoom gelijk gericht zijn en deze groepeerings bevordert, zooals voor andere organische zuren in de literatuur is beschreven, de complexvorming. In de eerste plaats moet dan ook aan deze groepeerings toegeschreven worden, dat galacturonzuur de meeste complexe verbindingen van de uronzuren opleverde.

Zooals bekend is, bevorderen ook gelijk gerichte ortho-standige hydroxylgroepen de neiging tot complexvorming. Vooral de complexen van boorzuur met organische verbindingen met ortho-standige gelijk gerichte hydroxylgroepen zijn grondig onderzocht door J. BÖESEKEN en zijn leerlingen.

Het is dan ook waarschijnlijk, dat in de tweede plaats de oplosbare complexe verbindingen der uronzuren aan de ortho-standige alcoholische hydroxylgroepen toegeschreven moeten worden. Hierbij moet evenwel opgemerkt worden, dat de gelijk gerichte hydroxylgroepen bij de suikers waarschijnlijk, dus ook bij de uronzuren, elkaar afstooten en dus niet volkomen evenwijdig gericht zijn.

Indien wij de uronzuren uit het oogpunt der gelijk gerichte hydroxylgroepen beschouwen, blijkt, dat α -galacturonzuur 2 paren, β -galacturonzuur 1 paar, α -mannuronzuur 1 paar, α -glucuronzuur 1 paar en β -glucuronzuur geen gelijk gerichte ortho-standige hydroxylgroepen in het molecuul draagt. In het geval van β -mannuronzuur hebben wij drie op elkaar volgende koolstofatomen, die gelijk gerichte hydroxylgroepen dragen. Deze volgorde is gelijk aan die, welke wij gevonden hebben voor de neiging tot complexvorming bij de uronzuren. Waarschijnlijk hebben dus ook hier de ortho-standige gelijk-

Reacties van alkaloiden met uronzuren			
Reagens	15%-ige Ammoniumzoutop		
	glucuronzuur	galacturonzuur	mannuronzuur
Zoutz. zout v. aconitine	+	+	+
„ „ „ apomorphine	—	—	—
„ „ „ atropine	—	—	—
„ „ „ berberine.	—	—	—
„ „ „ brucine.	—	+	—
Caffeïnecitraat	—	—	—
Zoutz. zout v. chinine	—	—	—
Chinidinesulfaat	—	—	—
Cinchoninesulfaat	—	—	—
Zoutz. zout v. cinchonidine	+	—	—
„ „ „ cocaïne	—	—	—
Salicylz. zout v. colchicine	—	—	—
Zoutz. zout v. coniïne	—	—	—
„ „ „ ecgonine	—	—	—
„ „ „ hydrastine	+	+	+
Hyoscyaminesulfaat	—	—	—
Hyoscynesulfaat	—	—	—
Zoutz. zout v. morphine	—	—	—
„ „ „ narcotine	+	+	+
„ „ „ nicotine	—	—	—
„ „ „ papaverine	+	+	+
Pelletierinesulfaat	—	—	—
Broomwaterstofz. zout v. scopolamine	—	—	—
Zoutz. zout v. thebaine	—	—	+
„ „ „ solanine	+	+	+

gerichte hydroxylgroepen invloed op de complexvorming.

Ook in het geval ascorbinezuur moet de complexvorming aan de hydroxylgroepen worden toegeschreven.

§ 4. Reacties van uronzuren en van enkele verwante zuren met alkaloiden.

De reacties met alkaloiden zijn microchemisch uitgevoerd door aan een druppel van een 15%-ige ammoniumzoutoplossing van het zuur een kristal van een mineraalzuurzout van een alkaloïde toe te voegen.

Alvorens tot een afzonderlijke bespreking over te gaan, geven wij eerst de resultaten in een tabelvorm weer (zie tabel XIV).

XIV.

en met enkele verwante zuren				
lossingen van			Bariumzout van ontledingsproduct van	
gluconzuur	ascorbinezuur	pentanonalzuur	galacturonzuur	mannuronzuur
+	+	+	+	+
—	—	+	+	+
—	—	—	—	—
—	—	+	+	+
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	+	+	+
—	—	+		
—	—	+		
—	—	+	+	+
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
+	+	+	+	+
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
+	+	+	+	+
—	—	—	—	—
+	+	+	+	+
—	—	+		
—	—	—	—	—
—	—	+	+	+
+	+	+	+	+

Wij zullen bij de bespreking der reacties met de alkaloiden de gebruikelijke groepenindeeling der alkaloiden van E. WINTERSTEIN en G. TRIER (268) volgen, en uitsluitend de positieve resultaten mededeelen.

De zouten van de, tot de *chinabasen* behorende, alkaloiden, chinine, chinidine, cinchonine en cinchonidine gaven geelbruine, amorfe precipitaten met het ammoniumzout van pentanon-4-al-5-zuur en met de bariumzouten van de ontledingsproducten uit galacturonzuur en uit mannuronzuur.

Verder gaf het ammoniumzout van glucuronzuur met het zoutzure zout van cinchonidine bij verhitting een neerslag, dat uit losse naalden en naaldenrozetten bestond. Deze reactie, die niet door

de andere uronzuren gegeven werd, is karakteristiek voor glucuronzuur. De gevoeligheid der reactie is echter niet groot.

Van de *strychninegroep* werd brucine gebruikt, dat alleen met ammoniumgalacturonaat een kristallijn neerslag gaf. Bij verhitting van een 15%-ige ammoniumgalacturonaatoplossing met het zoutzure zout van brucine werd een kristallijn precipitaat gevormd, dat uit dunne staafjes bestond, die veelal tot bundels waren vereenigd. Deze reactie is van belang, daar wij hierin een middel hebben om het galacturonzuur en glucuronzuur te onderscheiden.

Bij de laatstgenoemde reacties van glucuronzuur met cinchonidine en van galacturonzuur met brucine ontstaan werkelijke verbindingen en niet de vrije basen, daar de genoemde alkaloiden vrij sterke basen zijn.

Van de *morphine-alkaloiden* gaven apomorphine en thebaïne onoplosbare reactieproducten met het ammoniumzout van pentanonalzuur en met de bariumzouten van de ontledingsproducten van galacturonzuur en mannuronzuur.

Bij verhitting van het zoutzure zout van thebaïne met ammoniummannuronaat kregen wij een kristallijn precipitaat. Het gevormde neerslag bestond uit rozetten van naalden.

Van de *berberine-groep* gaf berberine, als zoutzure zout toegepast, met het ammoniumzout van pentanonalzuur en met de bariumzouten van de ontledingsproducten der uronzuren een amorf neerslag.

De alkaloiden van de *papaverine-groep* gaven met alle onderzochte ammoniumzouten een kristallijn neerslag.

Met het zoutzure zout van hydrastine werd een amorf precipitaat gevormd, dat bij verhitting kristallijn werd. Met de ammoniumuronaten werd slechts weinig precipitaat gevormd.

Hetzelfde beeld gaf echter eveneens zoowel ammoniak als natriumacetaat met het zoutzure zout van hydrastine te zien. Zeer waarschijnlijk hebben wij dus in deze gevallen met het vrije hydrastine te maken.

Het zoutzure zout van narcotine gaf met de ammoniumzouten der onderzochte zuren een kristallijn precipitaat, dat echter weer de vrije base was.

Met het zoutzure zout van papaverine kregen wij bij gewone temperatuur precipitaten met de ammoniumzouten van ascorbinezuur, van pentanonalzuur en van de ontledingsproducten der uronzuren.

Bij verhitting werden echter ook met de ammoniumuronaten en met ammoniumgluconaat kristallijne neerslagen gevormd. Hetzelfde gaf echter een natriumacetaat-toevoeging aan het zoutzure zout van papaverine ook te zien.

Wij hebben voor de neerslagen, verkregen door toevoeging van het zoutzure zout van papaverine aan de ammoniumzouten van glucuronzuur en galacturonzuur, nagegaan of de gevormde precipitaten inderdaad uit de vrije base zelf bestonden. Daartoe hebben wij de precipitaten afgefiltreerd, met water uitgewassen en boven geconcentreerd zwavelzuur gedroogd. Het smeltpunt van de kristallen, die bij verhitting van ammoniumgluconaat met papaverinehydrochloride gevormd waren, was 144°C . Bij mengen der kristallen met zuivere papaverine was het smeltpunt van het mengsel 147°C . Het smeltpunt van zuivere papaverine is eveneens 147°C . Ook het smeltpunt van de kristallen, die bij verhitting van ammoniumgalacturonaat met papaverinehydrochloride gevormd waren, was 143°C . Hiermede is dus het bewijs geleverd, dat wij in dit geval inderdaad de vrije base gekregen hadden.

Het alkalöide van de granaatboom, *pelletierine*, gaf, als zoutzuurzout, een weinig bruin, amorf precipitaat met het ammoniumzout van pentanonazuur.

Geen der ammoniumzouten gaf bij kamertemperatuur een neerslag met *het zoutzure zout van aconitine*. Bij verhitting werd echter bij alle een deels amorf, deels kristallijn, neerslag gevormd. Een overeenkomstig kristallijn neerslag werd met natriumacetaat verkregen, zoodat in deze gevallen weer de vrije base afgescheiden was.

Het zoutzure zout van solanine gaf bij kamertemperatuur met geen der ammoniumzouten een neerslag. Bij verhitting ontstond bij alle een amorf precipitaat, dat bij afkoelen weer in de vloeistof oploste.

Voor de microchemische reacties op de uronzuren met alkalöiden zijn dus de reacties van brucine op galacturonzuur en die van cinchonidine op glucuronzuur van belang. De overige kristallijne precipitaten van alkalöiden met de uronzuren waren, blijkens het voorafgaande, grootendeels de vrije basen zelf.

De verbindingen tusschen de uronzuren en de zwakbasische alkalöiden worden dus blijkbaar vaak door water, vooral bij verwarming, gehydrolyseerd tot uronzuren en de vrije basen, die zich

Reacties van neutrale zouten van organische basen met de			
Reagens	15%-ige Ammoniumzoutop		
	glucuronzuur	galacturonzuur	mannuronzuur
Zoutz. zout chinine	—	—	—
„ „ guanidine.	—	—	—
„ „ hydrazine.	—	—	—
„ „ pyridine	—	—	—
„ „ piperidine	—	—	—
„ „ chinoline	—	—	—
„ „ aniline	—	—	—
„ „ methylaniline	—	—	—
„ „ p-toluidine	—	—	—
„ „ o-toluidine	—	—	—
„ „ p-phenyleendiamine .	—	—	—
„ „ dimethyl-p-phenyleen-			
diamine	—	—	—
„ „ o-phenyleendiamine .	—	—	—
„ „ m-phenyleendiamine .	—	—	—
„ „ benzidine	+	+	+
„ „ α -naphtylamine . . .	+	+	+
ureumnitraat	—	—	—

amorf of kristallijn afscheiden. Wij kunnen dus alleen reacties verwachten met de sterker basische alkaloiden, waartoe ook de twee bovengenoemde alkaloiden, brucine en cinchonidine, behooren.

Macrochemisch zijn echter ook andere alkaloiden, dan de beide genoemden, geschikt voor het kwalitatieve aantoonen van de uronzuren en andere onderzoekers hebben hiervan reeds vroeger gebruik gemaakt.

Aan de smeltpunten van sommige zouten van alkaloiden kunnen de uronzuren worden geïdentificeerd. Een veel voor dit doel gebezigd alkaloid is cinchonine. Ook wij hebben dit alkaloid herhaaldelijk toegepast voor het identificeren der uronzuren. Daartoe werd het bariumpzout van het uronzuur in water opgelost en deze oplossing met iets ondermaat cinchoninesulfaat gekookt. Nadat het bariumsulfaat afgefiltreerd was, werd de oplossing in vacuüm boven geconcentreerd zwavelzuur ingedampd. Hierbij kristalliseerde

Deze reacties zijn als volgt uitgevoerd:

Aan een druppel van een 15%-ige ammoniumzoutoplossing van het onderzochte zuur werden eenige kristallen van het zoutzure zout van de organische base toegevoegd, waarna, zoo noodig, even boven een microbrander verhit werd.

Wij geven de resultaten in tabel XV weer.

De zoutzure zouten van benzidine en van α -naphthylamine gaven met de ammoniumzouten een kristallijn neerslag. Hetzelfde neerslag gaf echter ook natriumacetaat met de zoutzure zouten van benzidine en van α -naphthylamine, zoodat, evenals in sommige gevallen met de alkaloiden het geval was, de vrije basen geprecipiteerd waren.

Slechts het pentanon-4-al-5-zuur en de bariumzouten van de ontledingsproducten der uronzuren gaven met enkele zouten van organische basen (chinoline, p- en o-toluidine) een weinig, amorf precipitaat.

Opmerkelijk was echter de donkerroode kleur, die sommige aminen, o. a. aniline en p-phenyleendiamine, met de ammoniumzouten der uronzuren gaven. Deze kleur vertoonden ascorbinezuur, pentanonalzuur en de ontledingsproducten der uronzuren in geen enkel geval.

Ook furfurol geeft een roodkleuring met aniline-acetaat. Het is echter onwaarschijnlijk, dat de roodkleuring in deze gevallen op furfurolvorming zou berusten, daar reeds in de koude, bij toevoeging van een neutraal zout van uronzuur aan het amine, roodkleuring ontstaat.

Conclusies van § 2 tot en met § 5.

De resultaten van de reacties op de carboxylgroep der onderzochte zuren samenvattende, komen wij tot de volgende conclusies:

1e. Overeenkomstige reacties werden verkregen met het ammoniumzout van pentanon-4-al-5-zuur en met de bariumzouten van de ontledingsproducten van galacturonzuur en van mannuronzuur.

Hierdoor hebben wij een bewijs te meer voor de identiteit van het pentanon-4-al-5-zuur en de zure componenten van de ontledingsproducten, die bij verhitting der bariumuronaten gevormd worden, welke identiteit reeds in hoofdstuk XIII werd betoogd.

2e. Op ascorbinezuur werd een kleurreactie met uranyl-nitrat gevonden. Deze reactie is nader uitgewerkt voor het aantoonen van ascorbinezuur in plantaardige producten.

3e. De volgende reacties werden gevonden, die het glucuronzuur en galacturonzuur van elkaar onderscheiden.

Glucuronzuur gaf een kristallijne, onoplosbare verbinding met cinchonidine en galacturonzuur gaf een onoplosbare verbinding met brucine.

4e. De waarneming van F. EHRLICH, dat bij verhitting van het basische loodzout van galacturonzuur een roode verbinding ontstaat, die niet door de overige uronzuren gegeven wordt, werd bevestigd. Deze reactie is zeer geschikt voor het aantoonen van galacturonzuur.

5e. Voorts werd de reeds bekende onderscheidingsmethode der uronzuren aan de smeltpunten van enkele alkaloïdezouten, o. a. die van cinchoninezouten, bevestigd.

6e. Het bleek, dat de uronzuren, gluconzuur, ascorbinezuur en pentanonalzuur met sommige metalen oplosbare complexe verbindingen gaven.

Gluconzuur gaf de meeste, en pentanonalzuur de minste oplosbare complexe verbindingen.

HOOFDSTUK XV.

Overige reacties van uronzuren en van enkele verwante zuren; kwantitatieve bepalingen.

§ 1. Reacties op de carbonylgroep van de uronzuren van enkele verwante zuren met aminen.

Van de reacties op de aldehydegroep der onderzochte carbonylzuren komen in de eerste plaats die met phenylhydrazine en de afgeleiden daarvan in aanmerking.

Op deze reacties zullen wij hier niet verder ingaan, daar deze voor glucuronzuur (17, 34, 119, 262) reeds grootendeels onderzocht zijn, en voor galacturonzuur (184, 186, 190a) en mannuronzuur (186) momenteel uitgebreide onderzoekingen worden verricht.

Wij hebben de reacties op de carbonylgroep der onderzochte zuren met primaire aminen, in alcoholische en waterige oplossing, nagegaan.

In de literatuur hebben wij twee gevallen van verbindingen tusschen glucuronzuur en een amine kunnen vinden.

H. THIERFELDER (250) had een verbinding tusschen het glucuronzuur en aniline bereid door kaliumglucuronaat in alcoholische oplossing met aniline te koken, het filtraat in te dampen en uit dit ingedampte filtraat met absolute alcohol en aether de SCHIFFSche base te precipiteeren. De verbinding was samengesteld uit 1 kaliumglucuronaat op 1 aniline. Evenzoo heeft M. BERGMANN (17) een SCHIFFSche base van natriumglucuronaat en aniline bereid uit de aether-oplossing der componenten.

Wij hebben andere werkwijzen toegepast en wel de volgende:

a. In een reageerbuisje werden aan 3 druppels van een 15%-ige ammoniumzoutoplossing 2 druppels water en \pm 8 druppels 96%-ige alcohol toegevoegd. Aan deze oplossing werd een kristal of een druppel van de vrije primaire amine toegevoegd. Het reageerbuisje werd met een kurk gesloten, waarna wij het reageerbuisje gedurende 12 uren lieten staan.

b. Bij gebruik van een mineraalzuurzout van een primair amine werd een kristal daarvan in een reageerbuisje bij 3 druppels van een 15%-ige ammoniumzoutoplossing gevoegd. Bij deze oplossing werden eenige druppels ammoniak gedruppeld tot de vloe-

stof alkalisch reageerde. Vervolgens werden ± 8 druppels 96%-ige alcohol toegevoegd, waarna het reageerbuisje met een kurk gesloten werd. Na 12 uren werd het resultaat nagegaan.

c. In geval de vrije base in water oplosbaar was, werd geen alcohol toegevoegd. De verdere werkwijze was analoog aan die sub *a* of *b*.

De gebruikte 15%-ige ammoniumzoutoplossingen waren die van glucuronzuur, galacturonzuur, mannuronzuur, ascorbinezuur en pentanon-4-al-5-zuur. Wij zullen hier achtereenvolgens de verschillende reacties der aminen met de genoemde ammoniumzoutoplossingen bespreken.

Reacties met aniline. Deze reactie werd uitgevoerd in alcoholische oplossing met de vrije base (werkwijze *a*). Na $1\frac{1}{2}$ uur gaf de proef met galacturonzuur een kristallijne verbinding te zien.

Na ruim $1\frac{1}{2}$ uur werd een kristallijn precipitaat met glucuronzuur verkregen.

De kristallen bestonden in beide gevallen uit platte, rechthoekige plaatjes, die tusschen gekruiste nicols oplichtten.

Het smeltpunt van de verbinding van aniline met ammoniumglucuronaat was 125°C . en het smeltpunt van de verbinding van aniline met ammoniumgalacturonaat was $138\text{--}140^{\circ}\text{C}$. In beide gevallen smolten de verbindingen onder ontleding.

De overige ammoniumzouten gaven onder deze proefomstandigheden geen onoplosbare verbindingen met aniline.

Reacties met p-toluidine. Bij uitvoering volgens *a* werd met galacturonzuur na ongeveer 15 minuten een kristallijn precipitaat gevormd, waarvan de kristallen uit rechthoekjes bestonden, die volkomen op de hierboven beschreven kristallen geleken. (zie microfotografie VI). Deze reactie is echter veel gevoeliger, dan die met aniline.

Met glucuronzuur werd na $\frac{3}{4}$ uur eveneens een kristallijn precipitaat gevormd, waarvan de kristallen rechthoekjes waren.

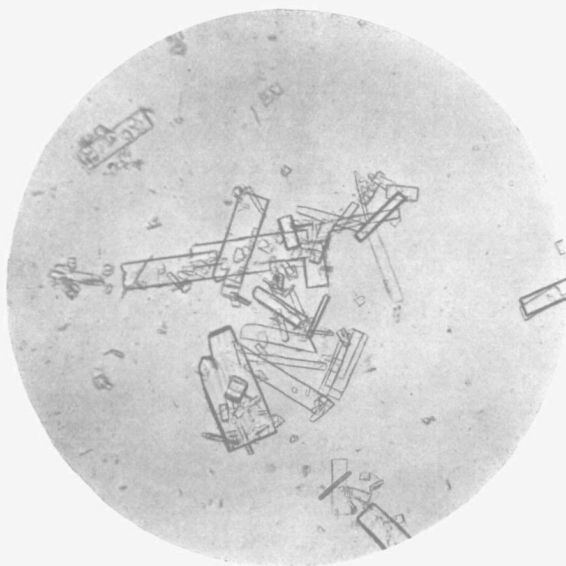
Met geen der overige ammoniumzouten werd een onoplosbare verbinding verkregen.

Er is een groot verschil in snelheid tusschen de reactie van toluidine met galacturonzuur en die van toluidine met glucuronzuur. Dit verschil wordt nog groter, indien wij de reacties met het zoutzure zout van toluidine uitvoeren, zooals sub *b* beschreven is. In het geval van galacturonzuur ontstond na ca. 15 minuten een kristallijn

precipitaat, terwijl met glucuronzuur eerst na eenige uren een kristallijn precipitaat werd gevormd.

Vervolgens hebben wij de mogelijkheid nagegaan, of deze reacties ook met andere stoffen optreden. Deze stoffen waren in het geval van galacturonzuur: 1e. het ammoniumzout van pentanonalzuur; 2e. het ammoniumzout van mannuronzuur; 3e. het ammoniumzout van glucuronzuur; 4e. arabinose; 5e. galactose; 6e. furfurol en 7e. natriumacetaat.

In al deze gevallen werd binnen 15 minuten een kristallijne verbinding gevormd, die uit rechthoekige kristallen bestond.



MICROFOTOGRAFIE VI.

Kristallen van de toluidineverbinding van galacturonzuur

(vergrooting: 62 ×).

Deze proef werd eveneens met glucuronzuur uitgevoerd. Behalve met natriumacetaat werd in alle gevallen na ongeveer 30 minuten een kristallijne verbinding verkregen. In het geval van natriumacetaat werd echter pas na 2 uren een kristallijn precipitaat gevormd.

Uit deze proeven zien wij, dat de reactie van toluïdine met galacturonzuur weinig gevoelig voor bijmengselen is.

Op deze wijze konden wij 10—15 mg galacturonzuur nog gemakkelijk aantonen. Het is echter onmogelijk het reactieproduct van galacturonzuur aan het smeltpunt der kristallen te onderscheiden van het reactieproduct van glucuronzuur.

In beide gevallen beginnen de verbindingen van toluïdine met genoemde ammoniumuronaten bij 100° C. te verkleuren en smelten bij 128—130° C. onder ontleding.

Een kenmerkend onderscheid is echter het verschil in de vormingsnelheid der verbindingen. Kristalliseert bij een proef, die volgens een der hierboven beschreven methoden uitgevoerd wordt, na 1 of 2 minuten de verbinding uit, dan hebben wij zonder eenige twijfel met galacturonzuur te maken.

Vervolgens hebben wij nagegaan, of met deze reactie galacturonzuur op eenvoudige wijze in plantenproducten aangetoond kan worden. Daartoe hebben wij eerst onderzocht, of een der suikers, waarmede galacturonzuur dikwijls als condensatieproduct in de natuur voorkomt, of een der producten, die bij de bereiding van galacturonzuur worden gevormd, de reactie met toluïdine gaf. Het bleek, dat galactose, arabinose, furfurol en pentanon-4-al-5-zuur deze reactie niet gaven.

Nu werd getracht om het galacturonzuur in citroenpectine aan te toonen. Daartoe werden ongeveer 500 mg pectine gedurende 1 à 1½ uur met 15 cm³ 20%-ig zwavelzuur op het waterbad verhit. Vervolgens werd de oplossing met ammoniak geneutraliseerd en op het waterbad ingedampt.

Aan de, tot een klein volume ingedamppte, vloeistof werd tweemaal het volume aan alcohol toegevoegd. De vloeistof werd afgefiltreerd en het filtraat werd met toluïdine op galacturonzuur onderzocht. Inderdaad werd er een weinig kristallijn precipitaat gevormd.

Het gevormde precipitaat was echter zoo gering, dat deze werkwijze niet geschikt is voor het kwalitatief aantonen van galacturonzuur.

Veel betere resultaten gaf de volgende werkwijze: Het te onderzoeken plantenproduct (in ons geval was dit pectine) werd gedurende 15 uren met 2,5%-ig zwavelzuur gehydrolyseerd, de oplossing met bariet en bariumcarbonaat geneutraliseerd, de vloeistof in vacuüm ingedampt en uit de ontkleurde oplossing het bariumgalacturonaat

met alcohol geprecipiteerd. Dit bariumzout werd vervolgens met ammoniumsulfaat in het ammoniumzout omgezet. Bij toepassing van deze werkwijze op pectine konden wij het galacturonzuur gemakkelijk aantonen.

Vervolgens hebben wij de toluïdineverbinding van galacturonzuur nader onderzocht.

In de eerste plaats werd nagegaan of de stof kristalwater bevatte. Bij verhitting der stof in een droogstoof op 100°C . ontleedde de stof, zoodat wij een droging bij een lagere temperatuur boven fosforpentoxyde toegepast hebben. Nadat de stof gedurende eenige dagen in vacuüm boven P_2O_5 bij 30°C . was gedroogd, was het gewicht daarvan slechts 1% achteruit gegaan.

De verbinding bevatte volgens de elementairanalyse, die volgens H. TER MEULEN uitgevoerd werd, 56.8% C en 6.9% H. Indien in de verbinding 1 glucuronzuur op 1 toluïdine voorkomt, zou zij volgens berekening 52,0% C en 6.7% H bevatten. Indien er op 1 glucuronzuur 2 toluïdine voorkomt, zou de verbinding volgens berekening 59,0% C en 7,1% H bevatten. Indien de laatstgenoemde verbinding 1 molecuul kristalwater bevat, zouden de uitkomsten 56,5% C en 7,3% H zijn. De eerste onderstellingen wijken zeer af van de gevonden waarden. De laatste onderstelling is met deze uitkomsten in goede overeenstemming.

Ter contrôle werd een elementairanalyse van de gebezigde toluïdine verricht. Deze bleek 78,5% C en 7,9% H te bevatten. Volgens berekening zouden de uitkomsten 78,5% C en 8,1% H moeten zijn.

Aangezien de elementairanalyse geen uitsluitsel gaf omtrent de aard der onderzochte toluïdineverbinding werd daarvan eveneens een stikstofbepaling volgens H. TER MEULEN verricht. Volgens berekening bevat een verbinding van 1 ammoniumgalacturonaat op 1 toluïdine 9,3% N, een verbinding van 1 ammoniumgalacturonaat op 2 toluïdine 10,3% N en wanneer de laatste verbinding één molecuul kristalwater bevat, zou het stikstofgehalte volgens berekening 10,0% zijn. Ons product bleek daarentegen 8,9% N te bevatten. Deze uitkomsten zouden verklaard kunnen worden door aan te nemen, dat een gedeelte van de ammoniak van de ammoniumverbinding door toluïdine is vervangen.

Reacties met m-toluïdine. De reactie met m-toluïdine gaf, bij uitvoering volgens de sub a beschreven methode, na ongeveer 1 uur met ammoniumgalacturonaat en ammoniumglucuronaat kristallijne preci-

pitaten. De kristallen bestonden in beide gevallen uit rechthoekjes en geleken volkomen op de kristallen der *p*-toluidine- en anilineverbindingen met de beide genoemde uronzuren.

De overige ammoniumzouten gaven geen onoplosbaar product.

Het zoutzure zout van *o*-toluidine (werkwijze *b*), *p*-nitroaniline (werkwijze *a*) en *a*-naphthylamine (werkwijze *a*) gaven met geen der onderzochte ammoniumzouten een onoplosbaar reactieproduct.

Met het zoutzure zout van β -naphthylamine werd volgens de, sub *b* beschreven, methode gereageerd. Het is echter een, onder de gekozen proefomstandigheden, moeilijk te vervolgen reactie, daar bij een blancoproef het β -naphthylamine zelf al een weinig uitkristalliseerde in afgebrokkelde plaatjes, die tusschen gekruiste nicols oplichtten.

Bij de proeven met galacturonzuur en glucuronzuur kregen wij een kristallijn neerslag, dat uit lange, smalle rechthoekjes bestond.

Reacties met benzidine. Benzidine bleek met de ammoniumzouten van glucuronzuur, galacturonzuur en mannuronzuur kristallijne producten te geven (werkwijze *a*). Het benzidine gaf geen onoplosbare producten met de ammoniumzouten van ascorbinezuur en pentanonalzuur.

Met de uronzuren bestond het neerslag in de drie gevallen uit ronde bolletjes (spherieten), die tusschen gekruiste nicols oplichtten. Na eenige dagen werden de kristallen donker gekleurd. Het is een gevoelige reactie op de uronzuren.

Bij verhitting ontleedden de kristallen zonder te smelten. Bij 95° C. begonnen de kristallen te verkleuren. Bij 200° C. waren de kristallen geheel zwart geworden.

Van de benzidineverbinding met galacturonzuur werd een elementairanalyse verricht. Het C-gehalte bedroeg 50.7% en het H-gehalte 6.1%. Volgens berekening zou bij een verbinding van 2 glucuronzuur op 1 benzidine het C-gehalte 50.5% en het H-gehalte 6.0% zijn, hetgeen met de gevonden waarden in goede overeenstemming is.

Glucosamine gaf in waterige oplossing (werkwijze *c*) geen onoplosbaar reactieproduct met een der ammoniumzouten.

p-Amido-azobenzol gaf in alcoholische oplossing (werkwijze *a*) uitsluitend een onoplosbaar product met ammoniummannuronaat. De reactie is echter niet gevoelig.

Urethaan, *para*-aminobenzoëzuur, ureum en hydrazine gaven noch in alcoholische oplossing (werkwijze *b*), noch in waterige oplossing

(werkwijze c) met een der ammoniumzouten een onoplosbaar product.

2-4-Tolueendiamine (werkwijze a) en het *zoutzure zout van guanidine* (werkwijze b) gaven in alcoholische oplossing geen onoplosbaar product.

Het *zoutzure zout van 2-5-diaminotoluol* gaf in waterige oplossing (werkwijze c) geen kristallijne producten met een der ammoniumzouten. Er werd bij de uronzuren en pentanonalzuur een weinig amorf precipitaat gevormd.

Het *zoutzure zout van p-phenyleendiamine* gaf geen reactie in alcoholische oplossing (werkwijze b). In waterige oplossing (werkwijze c) werd bij de proef met glucuronzuur een weinig neerslag gevormd, dat uit naalden en rozetten bestond, bij de proef met galacturonzuur werden eveneens eenige naalden en rozetten gevormd, bij de proef met pentanon-4-al-5-zuur ontstond een weinig amorf, bruin precipitaat en bij de proeven met mannuronzuur en ascorbinezuur werd geen precipitaat gevormd.

Er werd bij de proeven met galacturonzuur en glucuronzuur slechts weinig neerslag gevormd, zoodat wij niet van een reactie mogen spreken.

Meta- en ortho-phenyleendiamine gaven geen onoplosbare reactieproducten.

Behalve op de hierboven beschreven wijze hebben wij nog gereageerd met *aminen in tegenwoordigheid van geconcentreerd zoutzuur*.

Een weinig uronzuur werd daartoe met een kristal van een amine en eenige druppels geconcentreerd zoutzuur gedurende korte tijd verhit.

Bij toepassing van *p-nitro-aniline* werd de kleur bij de proeven met glucuronzuur, galacturonzuur en mannuronzuur donker en werd na eenige tijd een neerslag gevormd. Bij de proeven met pentanonalzuur en ascorbinezuur bleef de vloeistof kleurloos.

Hetzelfde beeld gaven de proeven van *aniline* en *toluidine* met de genoemde zuren, in tegenwoordigheid van geconcentreerd zoutzuur, te zien.

Samenvatting der resultaten van § 1.

Van een aantal onderzochte aminen bleken onder de beschreven omstandigheden toluidine en aniline kristallijne reactieproducten met galacturonzuur en glucuronzuur te geven.

Vooral de reactie van toluïdine met galacturonzuur is gevoelig, en verschilt van de, overigens gelijke, reactie van toluïdine met glucuronzuur door een veel snellere vorming van het reactieproduct. Benzidine geeft reacties met galacturonzuur, glucuronzuur en mannuronzuur. Ook deze reactie is gevoelig, doch voor de drie uronzuren volkomen gelijk.

Eenige andere aminen gaven eveneens een weinig precipitaat, doch deze reacties waren niet gevoelig en te subtiel, zoodat zij niet geschikt zijn voor het kwalitatief aantonen der uronzuren.

Pentanonalzuur en ascorbinezuur gaven geen reactieproducten met de primaire aminen.

§ 2. Gecombineerde reacties op de carbonyl- en de carboxylgroep van de uronzuren met aminen en alkaloiden.

Aangezien de gevonden reacties op de aldehyde-groep niet specifiek zijn voor een bepaald uronzuur, hebben wij deze reacties gecombineerd met de door ons gevonden reacties der alkaloiden op de uronzuren. Hiermede hoopten wij de specificiteit der carbonylreacties te verhoogen. De bedoelde reacties op de carbonyl-groep zijn die met aniline, *p*-toluïdine en benzidine, terwijl de gevonden alkaloidereacties op de carboxyl-groep die van brucine op galacturonzuur en van cinchonidine op glucuronzuur zijn.

Wij zullen hier de uitvoering van de gecombineerde reacties voor één geval uitvoerig weergeven en wel voor de reactie van de ammoniumzouten met *p*-toluïdine en *brucine*.

Aan 3 druppels van de onderzochte 15%-ige ammoniumzouten werden 1 druppel water, 7 druppels 96%-ige alcohol en eenige kristallen van brucine-hydrochloride en toluïdine toegevoegd. Dit mengsel werd in een kleine reageerbuis korte tijd boven een microbrander verhit. Na 2 minuten werd een dikke, kristallijne massa bij de proef met galacturonzuur gevormd. Na 30 minuten werd ook bij de proef met glucuronzuur een precipitaat gevormd. In beide gevallen bestonden de kristallen uit platte rechthoekjes. Bij de proeven met mannuronzuur, ascorbinezuur en pentanonalzuur werden geen onoplosbare producten verkregen.

Bij de uitvoering der proef met het zoutzure zout van *cinchonidine* en *toluïdine* werd met glucuronzuur een dikke brij gevormd. Eenige minuten later werd ook met galacturonzuur een kristallijn precipitaat gevormd. In beide gevallen bestond dit uit rechthoekige plaatjes. De overige ammoniumzouten gaven geen onoplosbare producten.

Dit resultaat is typeerend, daar bij alle vorige proefnemingen de toluïdineverbinding van galacturonzuur het eerst uitkristalliseerde.

In dit geval hebben wij een alkaloïde toegepast, die zelf al een onoplosbaar product met glucuronzuur en geen onoplosbaar reactieproduct met galacturonzuur geeft. Bij combinatie van deze cinchonidine-reactie met de toluïdine-reactie blijkt nu ook de glucuronzuurverbinding zich het eerst af te scheiden.

Bij uitvoering der proef met het *zoutzure zout van brucine* en *benzidine* werd met glucuronzuur, galacturonzuur en mannuronzuur onmiddellijk een, uit spherieten bestaand, precipitaat gevormd.

Bij toepassing van het *zoutzure zout van cinchonidine* en *benzidine* werden eveneens spherieten gevormd. Ook in dit geval werd met glucuronzuur het eerst een neerslag gevormd.

Als voorbeeld van een alkaloïde, dat geen precipitaten met de uronzuren gaf, werd *brucine* genomen.

Bij uitvoering der proef met *brucine* en *toluïdine* was er geen merkbare verandering ingetreden, vergeleken bij de *toluïdine*-reactie zonder toevoeging van alkaloïden. Na eenige minuten ontstond bij galacturonzuur en na ruim $\frac{1}{2}$ uur bij glucuronzuur, een uit rechthoekige plaatjes bestaand precipitaat.

§ 3. Kleurreacties op de uronzuren en op enkele verwante zuren.

De voornaamste der, in de literatuur bekende, kleurreacties op de uronzuren zijn: de naphtoresorcine-, de α -naphтол-, de phloroglucine-zoutzuur- en de BIAL'sche reactie. De eerste drie reacties hebben wij regelmatig bij ons onderzoek toegepast en zullen wij hier ook beschrijven.

a. De *naphtoresorcine-reactie* is door B. TOLLENS (254a) ontdekt. Bij koken van 5 cm³ eener glucuronzuuroplossing met 6 cm³ geconcentreerd zoutzuur en 1 cm³ eener alcoholische 1%-ige naphtoresorcine-oplossing wordt een kleurstof gevormd, die met aether uitgeschud kan worden. De kleur der aetherlaag is violet.

J. A. MANDEL en C. NEUBERG (148) toonden echter aan, dat talrijke aldehyd- en ketozuren deze reactie eveneens gaven. De reactie wordt echter, volgens deze onderzoekers, specifiek voor uronzuren, door de kleurstof met benzol, in plaats van met aether, uit te schudden (78, 182).

NEUBERG (183) heeft in 1933 de uitvoering gewijzigd door, in plaats van met geconcentreerd zoutzuur, met 2-n zoutzuur of met 50%-ig

zwavelzuur op het waterbad te verhitten. Volgens genoemde onderzoeker worden in dit geval geen verharsingsproducten gevormd en wordt de reactie daardoor veel gevoeliger.

Soms valt de TOLLENS'sche proef negatief uit. Dit is te wijten aan stoffen, die het naphtoresorcine „blokkeeren" (23).

Wij hebben de naphtoresorcine-reactie steeds als volgt uitgevoerd.

Een weinig (10 mg) van de te onderzoeken stof werd in 1 cm³ water opgelost. Aan deze oplossing werd 1 cm³ van een 1%-ige alcoholische naphtoresorcine-oplossing en 1 cm³ geconcentreerd zoutzuur toegevoegd, waarna de oplossing in een reageerbuis gedurende 1 minuut in de vlam tot koken verhit werd. Daarna werd de oplossing met eenige cm³ water verdund en onder de waterleiding afgekoeld. Vervolgens werd de oplossing met eenige cm³ benzol geschud.

Bij het aanwezig zijn van een uronzuur kleurde de benzollaag zich intensief violet.

Soms gebeurde het, dat de reactie negatief uitviel, hoewel toch een uronzuur aanwezig was. In dat geval werd, na het koken der stof met zoutzuur en naphtoresorcine, de oplossing afgekoeld. Aan deze afgekoelde oplossing werd nogmaals 1 cm³ van een 1%-ige alcoholische naphtoresorcine-oplossing toegevoegd en eerst daarna met benzol uitgeschud. Deze methode pasten wij op het carbonylzuur toe, dat wij bij de hydrolyse van fucoidinezuur verkregen.

Indien de kleur der benzollaag zwak is, voegen wij aan het water-benzol-mengsel ongeveer 10 cm³ water toe. De waterlaag van het water-benzol-mengsel bevat n.l. nog alcohol van de toegevoegde alcoholische naphtoresorcine-oplossing. De gevormde kleurstof is onoplosbaar in water, doch oplosbaar in alcohol, zoodat bij een vrij hooge alcoholconcentratie een gedeelte der kleurstof in de water-alcohol-laag opgelost blijft.

Glucuronzuur, galacturonzuur en mannuronzuur gaven een sterke naphtoresorcine-reactie. Pentanon-4-al-5-zuur en ascorbinezuur gaven geen naphtoresorcine-reactie.

b. De uronzuren geven een positieve *α*-naphtol-reactie. Voor glucuronzuur is deze het eerst aangetoond door G. GOLDSCHMIEDT (74).

De reactie werd door ons steeds als volgt uitgevoerd:

2 cm³ der uronzuuroplossing werd met 1 cm³ eener alcoholische *α* naphtol-oplossing tot kookpunt verhit en vervolgens afgekoeld. Bij voorzichtig toevoegen van zwavelzuur ontstaat er op de scheidingslaag van de oplossing en het zwavelzuur een violette kleur.

Glucuronzuur, galacturonzuur, mannuronzuur en ascorbinezuur

gaven een violette scheidingslaag. Beneden deze laag was de kleur blauwgroen tot groen.

Pentanonalzuur gaf een blauw gekleurde scheidingslaag. De groene kleur ontbrak.

c. De uronzuren geven, evenals de pentosen, de *phloroglucine-zoutzuur-reactie*.

Bij 1 minuut koken van 1 cm³ eener uronzuuroplossing met 5 cm³ van een, in 12%-ig zoutzuur verzadigde, phloroglucine-oplossing wordt de oplossing roodviolet gekleurd.

Glucuronzuur, galacturonzuur en mannuronzuur gaven een positieve, vitamine C en pentanonalzuur een negatieve reactie.

Behalve deze reacties hebben wij echter ook andere kleurreacties toegepast.

d. In de eerste plaats hebben wij de reactie van DENIGÈS (207), zooals deze voor het aantoonen van appelzuur gebezigd wordt, beproefd.

Daartoe wordt aan een weinig der te onderzoeken oplossing een weinig mercuri-acetaat-oplossing en azijnzuur toegevoegd. Deze oplossing wordt tot koken verhit, waarna een verdunde kaliumpermanganaatoplossing druppelsgewijze wordt toegevoegd.

Bij aanwezigheid van appelzuur ontstaat er een wit neerslag. Ook het zuur, dat bij hydrolyse van fucoïdinezuur werd gevormd, gaf deze reactie. Glucuronzuur, galacturonzuur, mannuronzuur, ascorbinezuur en pentanon-4-al-5-zuur gaven de reactie niet.

e. Vervolgens hebben wij nagegaan, welke der door ons onderzochte zuren de *diazo-reactie* (208) gaven.

Daartoe werd aan een alkalische oplossing van sulfanilzuur en natriumnitriet een weinig der te onderzoeken stof toegevoegd. Bij aanwezigheid van appelzuur wordt de oplossing roodviolet gekleurd.

Het bleek ons, dat galacturonzuur, glucuronzuur, mannuronzuur en pentanon-4-al-5-zuur een positieve diazo-reactie gaven. Bij ascorbinezuur viel de diazo-reactie negatief uit.

f. Vervolgens hebben wij de *antimoontrichloride-reactie*, zooals deze voor het aantoonen van vitamine A gebezigd wordt (30), op onze preparaten toegepast.

De oplossing werd bereid door 30 g, oppervlakkig met chloroform afgewassen en vervolgens gedroogd, antimoontrichloride aan 100 cm³ chloroform, die 1% alcohol bevatte, toe te voegen, en de

volgende dag de heldere bovenstaande vloeistof af te decanteeren.

De reactie werd door ons uitgevoerd volgens de methode van V. E. LEVINE (138). Daartoe werden aan ongeveer 20 mg stof 3 druppels chloroform en 0,5 cm³ azijnzuuranhydride toegevoegd en vervolgens werden bij dit mengsel 2 cm³ der antimoontrichloride-oplossing gedruppeld.

Indien wij deze proef uitvoerden met pyrrol, ontstond een mooie purperen kleur.

De volgende preparaten gaven echter geen van alle deze kleur-reactie te zien: Bariumgalacturonaat, bariumglucuronaat, bariummannuronaat, bariumzout van gehydrolyseerd fucoidinezuur, polymannuronzuur B, anhydro-polymannuronzuur en ascorbinezuur.

Bij uitvoering der proef met het bariumzout van pentanon-4-al-5-zuur werd de kleur na eenige uren ook een weinig rood gekleurd. Hetzelfde was het geval met het bariumzout van het ontledingsproduct van mannuronzuur.

g. Vervolgens hebben wij het gedrag der carbonylzuren ten opzichte van *geconcentreerd zwavelzuur* bepaald.

Daartoe werd aan een weinig van een der onderzochte zuren (glucuronzuur, galacturonzuur, mannuronzuur, ascorbinezuur of pentanonalzuur) ± 1 cm³ geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd en dit mengsel in een reageerbuis boven de vlam verhit.

Galacturonzuur en mannuronzuur werden rood tot bruin gekleurd, glucuronzuur werd bruin gekleurd en pentanonalzuur werd donker gekleurd. Het ascorbinezuur daarentegen bleef volkomen kleurloos.

h. Een zeer gevoelige kwalitatieve reactie op galacturonzuur, die wij toevallig bij onze proefnemingen opmerkten, is de volgende: Ongeveer 10 mg der te onderzoeken stof werden gedurende 24 uren bij kamertemperatuur in een reageerbuis met 1 cm³ geconcentreerd zwavelzuur behandeld. Vervolgens werden met een spuitfleschje ongeveer 10 cm³ water toegevoegd en de oplossing goed geschud. De oplossing werd intensief rood gekleurd.

Wij hebben dezelfde proef uitgevoerd met glucose, galactose, mannose, arabinose, xylose, glucuronzuur, mannuronzuur, ascorbinezuur en pentanon-4-al-5-zuur, doch geen dezer stoffen gaf de bovengenoemde kleurreactie. Bij al deze stoffen was de oplossing volkomen kleurloos of iets geelgroen gekleurd.

Bariumgalacturonaat, zooals wij het bij de bereiding uit citroenpectine verkrijgen, gaf deze kleurreactie heel duidelijk te zien. Wij

kunnen op deze wijze 5 tot 10 mg galacturonzuur gemakkelijk aantoonen.

Wij hebben uit de proeven de indruk gekregen, dat de aldehyde-groep van het galacturonzuur voor deze kleurreactie vrij moet zijn, daar noch pectine, noch polygalacturonide, noch de toluïdineverbinding van galacturonzuur deze kleurreactie gaf. De oplossing was, na verdunnen met water, in deze gevallen lichtgeelgroen gekleurd, zooals dat bij de andere uronzuren en suikers het geval is.

Vervolgens hebben wij nagegaan, of deze reactie geschikt was voor het aantoonen van galacturonzuur in plantenproducten.

Pectine geeft, zooals wij gezien hebben, de reactie niet, het bariumgalacturonaat, zooals wij het bij de bereiding uit pectine verkrijgen, geeft een duidelijke reactie.

Voor de bereiding van zulk bariumgalacturonaat hebben wij echter tamelijk veel uitgangsmateriaal noodig en verder vergt de bereiding veel tijd.

Het bleek ons, dat wij het galacturonzuur veel eenvoudiger als volgt aan konden toonen.

Ongeveer 250 mg pectine werden in een rondkolf, met stijgbuis, met 15 cm³ 20%-ig zwavelzuur gedurende 1½ à 2 uren op het waterbad verhit. De oplossing werd vervolgens met bariumcarbonaat geneutraliseerd en het filtraat werd op het waterbad tot ongeveer 5 cm³ ingedampt. Aan deze vloeistof werd overmaat 96%-ige alcohol toegevoegd en het weinig gevormde precipitaat op een hard filtreerpapierje afgefilterd. Dit neerslag werd in een reageerbuis gedaan en vervolgens werd 1 cm³ geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. Na 24 uren staan werd 10 cm³ water bijgegoten en het mengsel doorgeschud. De oplossing was helderrood gekleurd.

Deze methode kan zeer algemeen voor het aantoonen van galacturonzuur in plantenproducten toegepast worden. Daarnaast biedt deze reactie de mogelijkheid om na te gaan, of er ook vrij galacturonzuur in de planten voorkomt.

Verdere kleurreacties zijn reeds bij de metaalreacties op de carboxylgroep beschreven, n.l. de reactie met *basisch loodacetaat* op galacturonzuur (reactie van EHRlich) en de reacties met *uranyl-nitrat* en die met *ferro-* en *ferrisulfaat* op ascorbinezuur.

§ 4. Het aantoonen der uronzuren in plantaardige producten.

Met de bekende reacties op uronzuren en met de in de vorige paragrafen verkregen resultaten, kunnen wij het aantoonen der

uronzuren in plantaardige producten in het volgende voorschrift samenvatten.

Een positieve naphtoresorcine-reactie (met benzoluitschudding) wijst op de aanwezigheid van uronzuren.

Bij positief resultaat dezer reactie wordt in een voorproefje als volgt op galacturonzuur gereageerd: Een weinig der stof wordt gedurende $1\frac{1}{2}$ uur met een weinig 20%-ig zwavelzuur gehydrolyseerd, de oplossing met bariumcarbonaat geneutraliseerd en het bariumzout met alcohol uit de oplossing geprecipiteerd. Dit bariumzout wordt op de aanwezigheid van galacturonzuur onderzocht met de roode kleurreactie met geconcentreerd zwavelzuur.

Na deze eerste oriëntering wordt de te onderzoeken stof met zwavelzuur gehydrolyseerd en verder op het bariumzout verwerkt, zooals hiervoor is beschreven.

Een gedeelte van dit bariumzout wordt op galacturonzuur onderzocht met:

1e. de kleurreactie met geconcentreerd zwavelzuur, 2e. de kleurreactie met basisch loodacetaat (reactie van EHRLICH), 3e. de brucine-reactie.

Op glucuronzuur wordt met cinchonidine gereageerd. Indien voldoende bariumzout aanwezig is, wordt dit op het cinchoninezout verwerkt. Van dit cinchoninezout wordt een smeltpunt bepaald. Indien de aanwezigheid van meer dan één uronzuur vermoed wordt, wordt een gefractioneerde kristallisatie toegepast.

Een ander gedeelte van het bariumzout wordt met ammoniumsulfaat in het ammoniumzout omgezet. Op dit ammoniumzout wordt in alcoholische oplossing in de eerste plaats gereageerd met benzidine. Zoowel het glucuronzuur, galacturonzuur als het mannuronzuur geven een positieve reactie met benzidine. In de tweede plaats wordt op dit ammoniumzout gereageerd met aniline en toluïdine.

Een onoplosbaar reactieproduct met deze beide aminen geven glucuronzuur en galacturonzuur. Aan het smeltpunt der anilineverbinding kunnen wij deze beide uronzuren onderscheiden.

Indien deze reacties met de beide genoemde aminen negatief uitvallen, wordt gereageerd met toluïdine en brucine op galacturonzuur en met toluïdine en cinchonidine op glucuronzuur.

*Kwantitatieve bepalingen.***§ 5. De kwantitatieve koolzuur- en furfurolbepalingen van de uronzuren.**

Behalve enkele speciale bepalingen, die wij bij de literatuurhoofdstukken besproken hebben, bestaan er twee algemeene methoden voor de kwantitatieve bepaling der uronzuren.

In de eerste plaats komt de koolzuurbepaling van B. TOLLENS en K. LEFÈVRE (133, 149) in aanmerking. Door verschillende onderzoekers zijn modificaties op de oorspronkelijke bepaling aangebracht (44, 54, 157, 167, 228). De methode berust in principe op de afsplitsing van koolzuur van uronzuren, bij koken met 12%-ig zoutzuur.

Wij hebben bij onze koolzuurbepalingen, bij koken van galacturonzuur met verdund zwavelzuur, het door A. C. SLOEP (228) gebezigde toestel toegepast. Proefnemingen met 12%-ig zoutzuur zijn door ons niet verricht.

De tweede methode, om de uronzuren kwantitatief te bepalen, is de furfurol-phloroglucide-methode van KRÜGER-TOLLENS-LEFÈVRE (54, 133, 228).

Deze methode berust op het feit, dat de uronzuren bij koken met 12%-ig zoutzuur onder koolzuur- en waterafsplitsing gedeeltelijk in furfurol overgaan.

De uitvoering der proef is als volgt:

Een rondkolf met wijde hals van 300 cm³ inhoud wordt afgesloten met een rubberstop, waarin 2 openingen aangebracht zijn. In de eene opening is een druppeltrechter en in de andere opening een spatbol aangebracht, waaraan een koeler bevestigd is.

In de kolf worden 300 mg der te onderzoeken stof en 100 cm³ 12%-ig zoutzuur gebracht. Deze oplossing wordt tot koken verhit in een metaalbad.

Als 30 cm³ vloeistof overgedestilleerd zijn, laten wij 30 cm³ 12%-ig zoutzuur door de druppeltrechter in de kolf druppelen. Vervolgens worden weer 30 cm³ vloeistof overgedestilleerd, waarna opnieuw 30 cm³ 12%-ig zoutzuur toegevoegd worden. Deze behandeling wordt herhaald, tot er in het destillaat geen furfurol meer met anilineacetaat aangetoond kan worden.

Aan de verzamelde destillaten, die het afgesplitste furfurol bevatten,

worden 30 cm³, met phloroglucine verzadigd, 12%-ig zoutzuur toegevoegd. Vervolgens wordt de vloeistof met 12%-ig zoutzuur tot een volume van 400 cm³ aangevuld. De vloeistof kleurt zich groen en wordt troebel. De volgende dag wordt het zwart gekleurde gevormde precipitaat van furfurolphloroglucide door een Goochsche filter afgefiltreerd, waarna het kroesje gedurende 4 uren bij 100° C. gedroogd en vervolgens gewogen wordt.

De op deze wijze verrichte furfurolbepalingen der uronzuren gaven de volgende uitkomsten (zie tabel XVI).

TABEL XVI.

Furfurolbepalingen der uronzuren			
Uitgangproduct	Afgewogen in mg	mg Furfurolphloroglucide	mg Furfurolphloroglucide op 300 mg uronzuur
Mannuronzuurlacton (zie tabel V)			97.7
Bariumgalacturonaat	279.9	70.1	102.2
Glucuronzuur	302.4	104.2	
„	305.7	104.6	103.0

Ten slotte hebben wij nog nagegaan, of de uronzuren vergist konden worden.

De literatuur meldt hieromtrent eenige proefnemingen met glucuronzuur. Volgens C. NEUBERG wordt dit zuur niet vergist. Volgens A. DAIBER (43) wordt het glucuronzuur wel naast veel glucose vergist.

Daarentegen vond HILDEBRANDT (101), dat kleine hoeveelheden van het vrije zuur wel vergist konden worden.

Wij hebben de vergistingsproeven uitgevoerd met persgist met de microsaccharimeter van H. J. v. LUTSENBURG MAAS en G. v. ITERSON Jr. (145). Als contrôleproef gebruikten wij glucose. In de onderstaande tabel zijn de resultaten vereenigd.

TABEL XVII.

Afleringen bij vergistingsproeven der uronzuren met persgist				
Aflezing der kwikstand	Natriumglucuronaatopl. c = 5.1%	Natriumgalacturonaatopl. c = 5.0%	Galacturonzuuropl. c = 5.1%	Glucoseopl. c = 3.0%
I Kwik	+ 10	+ 12	+ 21	+ 7
II Kwik + opl.	+ 87	+ 78	+ 88	+ 92
III Kwik + opl. + gist	+ 162	+ 148	+ 169	+ 161
IV Na dicht lakken	+ 178	+ 162	+ 183	+ 174
V Na 6 uren op 30° C.	+ 176	+ 161	+ 183	+ 592

Noch de natriumzouten van galacturonzuur en glucuronzuur, noch het vrije galacturonzuur worden dus door persgist vergist. Wij hebben niet nagegaan, of de vergisting der uronzuren wel plaats heeft in tegenwoordigheid van glucose, zooals door DAIBER werd gevonden.

SAMENVATTING DER RESULTATEN.

- 1e. De uronzuren en het ascorbinezuur werden uit plantaardige producten in kristallijne toestand geïsoleerd.

Het *glucuronzuur* werd volgens twee verschillende methoden van F. WEINMANN uit arabische gom bereid en werd verder ook uit Indisch geel (pioeri) verkregen.

Het *galacturonzuur* werd uit citroenpectine volgens de methode van F. EHRLICH en uit polygalacturonide „Citruspectin” volgens de methode van K. P. LINK verkregen.

Het *mannuronzuurlacton* werd volgens de methode van W. L. NELSON en volgens die van K. P. LINK uit gedroogd materiaal van *Fucus serratus* bereid. Deze methoden gaven geen goede resultaten. Er werd echter een methode uitgewerkt, waarbij wij het lacton van mannuronzuur met een goed rendement uit het genoemde algenmateriaal verkregen.

- 2e. Van het, uit gedroogd materiaal van *Fucus serratus* bereide, *fucoidinezuur* werden de eigenschappen bepaald en daarmee werden eenige kwantitatieve bepalingen verricht.

Bij hydrolyse van het fucoidinezuur met verdund zwavelzuur ontstond fucose en een mengsel van twee zuren.

De fucose werd kristallijn uit het hydrolysaat geïsoleerd.

Het mengsel der beide zuren werd gescheiden in een zuur, dat in eigenschappen met citroenzuur overeenkwam, en in een carbonyl-oxy-zuur, dat waarschijnlijk een keto-oxy-zuur is. De constitutie van dit laatste zuur is echter nog niet opgehelderd.

- 3e. Volgens de methode van H. KYLIN werd uit het hierboven reeds genoemde materiaal van algen *polymannuronzuur A* (alginezuur) en *polymannuronzuur B* (fucinezuur) bereid.

In tegenstelling met de bewering van sommige onderzoekers, bleken de beide polymannuronzuren uit slechts één enkele zuurcomponent opgebouwd te zijn, hetgeen o.m. volgde uit een

gefractioneerde scheiding der cinchoninezouten der hydrolyseproducten.

De methyleeringsproeven maakten de aanwezigheid van twee hydroxylgroepen per zes koolstofatomen waarschijnlijk. Hierbij werd tevens gewezen op het eigenaardige gedrag der zuren bij de methyleering.

De reductieproeven met de polymannuronzuren hebben geen resultaten opgeleverd.

De methyleeringsproeven en de verdere eigenschappen der polymannuronzuren hebben tot de opstelling van een langgestrekte constitutieformule geleid.

In de asch der polymannuronzuren kon fosforzuur aangetoond worden.

Onder de hydrolyseproducten van polymannuronzuur A konden kleine hoeveelheden mannose en onder de hydrolyseproducten van polymannuronzuur B konden kleine hoeveelheden fucose aangetoond worden.

De aanwezigheid van mannose is van belang, vanwege de, door vele onderzoekers reeds vroeger verkondigde, stelling, dat in de planten de uronzuren uit de overeenkomstige hexosen gevormd worden.

- 4e. Na *decarboxyleering* der uronzuren met verdunde minerale zuren konden de overeenkomstige pentosen in kleine hoeveelheden onder de ontledingsproducten aangetoond worden.

Na koken van glucuronzuur met 4%-ig zwavelzuur kon onder de ontledingsproducten d-xylose en bij koken van galacturonzuur met 2%-ig zwavelzuur, met 1%-ig oxaalzuur en met 1%-ig fluorwaterstofzuur kon l-arabinose aangetoond worden.

Na koken van mannuronzuur met 2,5%-ig zwavelzuur kon de aanwezigheid van d-lyxose onder de ontledingsproducten waarschijnlijk gemaakt worden.

- 5e. Ten einde de sub 4 genoemde *lyxose* te kunnen identificeren werd deze pentose synthetisch uit galactose bereid volgens de methode van O. RUFF en G. OLLENDORFF.

- 6e. Bij behandeling van *polymannuronzuur B* met verdund zwavelzuur werd niet, zoals verwacht werd, een hemicellulose (poly-

- uronide) gevormd, doch werd *anhydro-polymannuronzuur* gevormd.
- 7e. De *furfurolvorming* uit de uronzuren verloopt ten deele over de overeenkomstige pentosen.
Bij deze reactie overweegt echter de gelijktijdige koolzuur- en waterafsplitsing, die waarschijnlijk zoodanig is op te vatten, dat de intermediair-gevormde pentose water afstaat.
- 8e. De *koolzuurafsplitsing* uit uronzuren bij koken met minerale zuren verloopt ten deele onder gelijktijdige furfurolvorming, ten deele echter zonder deze en onder vorming van pentanon-4-al-5-zuur als tusschenproduct.
- 9e. Bij verhitting eener oplossing van bariumgalacturonaat werd het bariumzout van het *pentanon-4-al-5-zuur* gevormd.
Het zuur had alle reacties gemeen met het, synthetisch uit laevulinezuur bereide, pentanon-4-al-5-zuur.
- 10e. Behalve de bekende verbindingen van de uronzuren en van enkele verwante zuren met metaalionen werden voorts nog de volgende reacties gevonden:
glucuronzuur geeft een onoplosbare, kristallijne verbinding met cinchonidine;
galacturonzuur geeft een onoplosbare, kristallijne verbinding met brucine;
de uronzuren bleken ook gemakkelijk complexe verbindingen met de metalen te vormen. Met de gebezigde metalen gaf galacturonzuur de meeste en glucuronzuur de minste oplosbare complexe verbindingen.
- 11e. Behalve de bekende reacties op de aldehydegroep van de uronzuren en van enkele verwante zuren, werden nog de volgende reacties van deze zuren met *aminen* gevonden:
glucuronzuur en *galacturonzuur* geven onoplosbare, kristallijne verbindingen (rechthoekige plaatjes) met toluïdine en met aniline; vooral de reactie van galacturonzuur met toluïdine is gevoelig;

glucuronzuur, *galacturonzuur* en *mannuronzuur* geven kristallijne onoplosbare verbindingen (spherieten) met benzidine.

Bij combineeren dezer reacties met de gevonden reacties op de carboxylgroep met brucine en met cinchonine werd de gevoeligheid vergroot; het was mogelijk, door een verschil in vormingssnelheid der reactieproducten, *glucuronzuur* en *galacturonzuur* van elkaar te onderscheiden.

- 12e. Behalve de bekende *kleurreacties* werden nog eenige kleurreacties op de onderzochte zuren gevonden:

vitamine C geeft een bloedroode kleur met uranyl-nitrat; wij konden *vitamine C* met deze reactie in sap van één sinaasappelschijfje aantoonen;

de *uronzuren* geven een positieve uitkomst en *vitamine C* geeft een negatieve uitkomst met de diazo-reactie;

galacturonzuur geeft een roode kleur bij behandeling op een bepaalde wijze met geconcentreerd zwavelzuur; deze reactie is zeer gevoelig en specifiek; met deze reactie konden wij gemakkelijk *galacturonzuur* in pectine aantoonen.

- 13e. Door toepassing van de bekende en van de nieuw gevonden reacties konden wij een voorschrift samenstellen voor het aantoonen der verschillende *uronzuren* in plantaardige producten.

- 14e. De natriumzouten van *glucuronzuur* en van *galacturonzuur* worden, evenals het vrije *galacturonzuur*, door persgist niet vergist, hetgeen met vroegere waarnemingen in overeenstemming is.
-

LITERATUUR.

(1) E. ABDERHALDEN, *Biochem. Handlexikon*. Bd. II, 1911, p. 521. — (2) Idem, Bd. VIII, 1914, p. 275. — (3) *Handb. d. biol. Arbeitsmeth.* Bd. I, Fl. 5, Kohlenhydrate 1922, p. 195. — (4) Idem, p. 1074. — (5) G. F. AHMANN en M. D. HOOKER, *Univ. Missouri Coll. Agric. Expt. Sta. Rec. Res. Bull.* 1925, p. 77. The estimation of pectin and a study of the constitution of pectin. — (6) W. ALBERDA v. EKENSTEIN en J. J. BLANKSMA, *Chem. Weekbl.* 7-388-1910. Over de vorming van laevulinezuur uit hexosen. — (7) E. ANDERSON en L. OTIS, *J. Am. Chem. Soc.* 52-4461-1930. The composition and structure of mesquite gum. — (8) E. ANDERSON en S. KINSMAN, *J. Biol. Chem.* 94-39-1931. Studies on the hemicelluloses. II. The composition of the hemicellulose from cottonseed hulls. — (9) S. AOYAMA, *J. pharmac. Soc. Jap.* 49-100-1929; cit. n. *Chem. Zentr.* 1929, II, p. 1930. — (10) *J. pharmac. Soc. Jap.* 50-75-1930, cit. n. *Chem. Zentr.* 1930, II, p. 1383. — (11) *J. pharmac. Soc. Jap.* 51-29-1931, cit. n. *Chem. Zentr.* 1931, II, p. 1868. — (12) K. ATSUKI en Y. TOMODA, *J. Soc. Chem. Ind. Jap.* 29-509-1926. — (13) R. G. AULT, D. K. BAIRD, H. C. CARRINGTON, W. N. HAWORTH, R. HERBERT, E. L. HIRST, E. G. V. PERCIVAL, F. SMITH en M. STACEY, *J. Chem. Soc.* 1933, p. 1419. Synthesis of d- and l-ascorbic acid and of analogues substances.

(14) D. K. BAIRD, W. N. HAWORTH, R. HERBERT, E. L. HIRST, F. SMITH en M. STACEY, *J. Chem. Soc.* 1934, p. 6. Ascorbic acid and synthetic analogues. — (15) BEHRENS-KLEY, *Org. Mikrochem. Analyse* 1922, p. 311. — (16) Idem, p. 334. — (17) M. BERGMANN en W. WALTER WOLFF, *Ber.* 56-1060-1923. Synthese der Glucuronsäure aus Traubenzucker. — (18) M. BIAL, *Chem. Zentr.* 1908, I, p. 1076. — (19) J. BIBERFELD, *Biochem. Z.* 65-479-1914. Zum Verhalten der Glucuronsäure im Organismus. — (20) TH. W. BIRCH, L. J. HARRIS en S. N. RAY, *Biochem J.* 27-590-1933. A micro-chemical method for determining the hexuronic acid (vitamin C) content of foodstuffs, etc. — (21) TH. W. BIRCH, L. J. HARRIS, S. N. RAY en W. J. DANN, *Nature* 131-273-1933. Hexuronic (ascorbic) acid as the antiscorbutic factor. — (22) G. M. BIRD en P. HAAS, *Biochem J.* 25-403-1931. On the nature of the cellwall constituents of *Laminaria* spp. Mannuronic acid. — (23) M. BRULÉ, H. GARBAN en A. AMER, *C. r. Soc. de Biologie* 92-1216, cit. n. *Chem. Zentr.* 1925, II, p. 1375. — (24) E. BUSOLT, *Chem. Zentr.* 1914, II, p. 574. — (24) Idem, 1917, p. 1008. — (26) C. L. BUTLER en L. H. CRETCHER, *Science* 68-116-1928. The nature of the acidic substance, formed on the hydrolysis of Acacia. — (27) *J. Am. Chem. Soc.* 51-1519-1929. The composition of gum arabic. — (28) Idem, 52-4509-1930. The composition of Salkowski's araban.

(29) E. J. CANDLIN en S. B. SCHRIJVER, *Proc. Roy. Soc.* 103, B-365-1928. — (30) F. H. CARR en E. A. PRICE, *Biochem. J.* 20-497-1926. Colour reactions attributed to vitamin A. — (31) S. W. CHALLINOR, W. N. HAWORTH en E. L. HIRST, *J. Chem. Soc.* 1931, p. 258. The compound uronic acids. Structure of the aldobionic acid from gum arabic. — (32) G. DE CHALMOT, *Ber.* 27-2722-1894. Die Bildung der Pentosane in den

Pflanzen. — (33) M. CHIRAY, Chem. Zentr. 1922, IV, p. 870. — (34) D. CHOUGHAK, C. r. Acad. Sci. Paris 186-520. — (35) J. K. CHOWDHURY en T. M. SAKA, Journ. Ind. Chem. Soc. 7-347-1930, cit. n. Chem. Zentr. 1931, I, p. 450. — (36) G. H. A. CLOWES en B. TOLLENS, Ann. 310-164-1900, Über Formaldehyd-oder Methylenderivate der Säuren der Zuckergruppe. — (37) E. P. CLARK, J. Biol. Chem. 31-605-1917. The preparation of lyxose. — (38) COLIN, Bull. Soc. Chem. Biol. 12-1392-1930. — (39) C. M. CONRAD, J. Am. Chem. Soc. 53-1999-1931. Decarboxylation studies on pectins and calcium pectates. — (40) Idem, 53-2282-1931. The decarboxylation of d-galacturonic acid, with special reference to the hypothetical formation of l-arabinose. — (41) E. G. COX, E. L. HIRST en R. J. W. REYNOLDS, Nature 130-888-1932. Hexuronic acid as the antiscorbic factor. — (42) E. G. COX, E. L. HIRST, Nature 131-402-1933. Constitution of vitamin C.

(43) A. DAIBER, Schweiz. Wochenschr. f. Chemie u. Pharmacie. 33-229-1885, cit. n. C. NEUBERG, Der Harn. Berlin, 1911, p. 429. — (44) A. D. DICKSON, H. OTTERSON en K. P. LINK, J. Am. Chem. Soc. 52-775-1930. A method for the determination of uronic acids. — (45) Z. DISCHE, Biochem. Z. 189-77-1927, Über charakteristische Farbreaktionen der Milchsäure, des Methylglyoxals und der Kohlenhydrate mit Carbazol und Schwefelsäure. — (46) G. DÜLL, Chem. Ztg. 19-216-1895. Über die Einwirkung von Oxalsäure auf Inulin.

(47) F. EHRLICH, Chem Ztg. 41-197-1917. Die Pektinstoffe, ihre Konstitution und Bedeutung. — (48) Dtsch. Zuckerind. 49-1046-1924. Über die Pektinstoffe und ihre Bedeutung für die Zuckerindustrie. — (49) F. EHRLICH en K. REHORST, Ber. 58-1889-1925. Zur Kenntnis der d-Glucuronsäure. — (50) F. EHRLICH en R. v. SOMMERFELD, Biochem. Z. 168-263-1926. Die Zusammensetzung der Pektinstoffe der Zuckerrübe. — (51) F. EHRLICH en F. SCHUBERT, Biochem. Z. 169-13-1926. Über die Chemie der Inkrusten des Flachses. — (52) Biochem. Z. 203-343-1928. Über Tetra-Araban und seine Beziehung zur Tetra-Galacturonsäure, dem Hauptcomplex der Pektinstoffe. — (53) F. EHRLICH in C. OPPENHEIMER, Die Fermente u. ihre Wirkungen. 3-926-1928. — (54) F. EHRLICH en F. SCHUBERT, Ber. 62-1982-1929. Über die Chemie der Pektinstoffe. Tetra-Galacturonsäuren und d-Galacturonsäure aus dem Pektin der Zuckerrübe. — (55) F. EHRLICH en K. REHORST, Ber. 62-628-1929. Zur Kenntnis der d-Glucuronsäure. — (56) F. EHRLICH en A. KOSHMAHLY, Biochem. Z. 212-162-1929. Über die Chemie des Pektins der Obstfrüchte. — (57) F. EHRLICH, Cellulosechemie 11-140-1930. Chemie des Pektins und seine Beziehung zur Bildung der Inkrusten der Cellulose. — (58) F. EHRLICH, Ber. 65-352-1932. Über die Chemie des Pektins. Eine typische Reaktion der d-Galacturonsäure und des Pektins. — (59) F. EHRLICH, Biochem. Z. 250-525-1932. Über die Pektolase, ein neu aufgefundenes Pektinferment. I. — (60) F. EHRLICH, Biochem. Z. 251-204-1933. Über die Pektolase, ein neu aufgefundenes Pektinferment. II. — (61) F. EHRLICH in G. KLEIN, Handb. der Pflanzenanalyse 1932, Bd. III, p. 80. — (62) F. EHRLICH en R. GUTTMANN, Biochem. Z. 259-100-1933. Über die präparative Gewinnung der d-Galacturonsäure aus Pektin.

(63) O. FABER en B. TOLLENS, Ber. 32-2589-1899. Untersuchungen über die Oxycellulose. — (64) TH. v. FELLEBERG, Biochem. Z. 85-118-1918. Über die Konstitution der Pektinkörper. — (65) E. FISCHER, Ber. 23-930-1890. Reduktion der Säuren der Zuckergruppe. II. — (66) E. FISCHER en O. PILOTY, Ber. 24-522-1891. Reduktion der Zuckersäure. — (67) E. FISCHER, Ber. 24-2136-1891. Über ein neues Isomeres der Schleimsäure und die sogenannte Paraschleimsäure. — (68) E. FISCHER en J. HERTZ, Ber. 25-1247-1892. Reduktion der Schleimsäure. — (69) E. FISCHER, Ann. 288-139-1895. Über kohlenstoffreichen Zucker aus Galactose. — (70) H. FITTING, Pringsh. Jhrb. 67-537-1928. Untersuchungen über Chemodinese bei Vallisneria.

(71) W. F. GOEBEL, J. Biol. Chem. 74-619-1927. The soluble specific substance of Friedländer's Bacillus. IV. On the nature of the hydrolytic products of the specific carbohydrate from Type A. Friedländer Bacillus. — (72) W. F. GOEBEL en H. F. BABERS, J. Biol. Chem. 100-573-1933. Derivatives of glucuronic acid. I. The preparation of glucuronic acid from glucuron and a comparison of their reducing values. — (73) G. GOLDSCHMIEDT en ZERNER, Monatsch. 31-439-1910. — (74) Z. physiol. Chem. 67-194-1910. Über den Nachweis der Glucuronsäure im Harne. — (75) M. GONNERMAN, Biochem. Z. 97-24-1919. Die Saponine von *Chenopodium Quinoa* (Reismelde), *Euphorbia (Tithyma us helioscopius)*, *Euphorbia Peplus*, *Mercurialis perennis*. — (76) G. GRIEBEL en G. STEINHOFF, Chem. Zentr. 1931, I, p. 3026. — (77) A. GÜNTHER en B. TOLLENS, Ber. 23-2585-1890. Über die Fucose, einen der Rhamnose isomeren Zucker aus Seetang (Fucus Arten).

(78) A. W. v. D. HAAR, Biochem. Z. 88-205-1918. Über den Nachweis der d-Glucuronsäure und ähnlich sich verhaltenden Säuren mittels der Naphtoresorcinreaktion. — (79) Anl. z. Nachweis. z. Trennung u. Best. der Monosaccharide u. Aldehydsäuren 1920, p. 58. — (79a) Idem. p. 68. — (80) Idem, p. 73. — (81) Idem, p. 80. — (82), Idem p. 178. — (83) Idem, p. 228. — (84) Rec. trav. chim. 42-1080-1923. Untersuchungen über die Saponine. — (85) Idem, 48-726-1929. Untersuchungen über die Saponine und verwandte Körper. — (86) E. HÄGGLUND, F. W. KLINGSTEDT, T. ROSENQUIST en H. URBAN, Z. physiol. Chem. 177-248-1928. Über die Kohlenhydratbestandteile der leicht hydrolysierbaren Hemicellulose von Fichte. — (87) J. HÄMÄLÄINEN, Skand. Arch. f. Physiol. 23-86-1909, cit. n. Chem. Zentr. 1910, I, p. 44. — (88) J. HÄMÄLÄINEN en J. SJOSTRÖM, Skand. Arch. f. Physiol. 24-113-1910, cit. n. Chem. Zentr. 1911, I, p. 412. — (89) M. HÄNDEL, Z. f. d. ges. exp. Medizin 42-172, cit. n. Chem. Zentr. 1924, II, p. 1706. — (90) L. J. HARRIS en S. N. RAY, Biochem. J. 27-302-1933. Vitamin C and the suprarenal cortex. — (91) W. N. HAWORTH en E. L. HIRST, J. Chem. Soc. 1928, p. 1228. Ringstructure and optical relationships in the mannose-rhamnose-lyxose series of sugars. Isolations of a new form of lyxose. — (92) W. N. HAWORTH, The constitution of sugars 1929, p. 37. — (93) J. chem. Soc. 1931, p. 821. Polysacchariden. VI. Trimethylcellulose. — (94) J. Soc. Chem. Ind. 52-482-1933. The constitution of ascorbic acid. — (95) M. HEIDELBERGER en O. T. AVERY, Chem. Zentr. 1924, II, p. 2174. — (96) M. HEIDELBERGER en W. F. GOEBEL, J. Biol. Chem. 74-613-1927. The soluble specific substance of Pneumococcus. V. On the chemical nature of the aldobionic acid from the specific polysaccharide of type III Pneumococcus. — (97) M. HEIDELBERGER en F. E. KENDALL, J. Biol. Chem. 84-639-1929. A crystalline aldobionic acid derived from gum arabic. — (98) R. W. HERBERT, E. L. HIRST, E. G. V. PERCIVAL, R. J. W. REYNOLDS en F. SMITH, J. Chem. Soc. 1933, p. 1270. The constitution of ascorbic acid. — (99) A. HERZFELD, Dtsch. Ztschr. f. Rübenzuckerind. 28-295-667-1891. — (100) Idem, 30-173-1893. — (101) HILDEBRANDT, Beitr. Z. Chem. Phys. u. Path. 7-439-1905, cit. n. E. ABDERHALDEN, Handb. d. biol. Arbeitsmeth. I, Tl. 5, Kohlenhydrate, p. 1067. — (102) E. L. HIRST en R. J. W. REYNOLDS, Nature 129-576-1932. Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. — (103) E. L. HIRST, J. Soc. Chem. Ind. 52-221-1933. Configuration of ascorbic acid and proposal of a lactone formula. — (104) E. L. HIRST, E. G. V. PERCIVAL en F. SMITH, Nature 131-617-1933. Constitution of ascorbic acid. — (105) D. R. HOAGLAND en L. L. LIEB, J. Biol. Chem. 23-287-1915. The complex carbohydrates and forms of sulphur in marine algae of the Pacific coast. — (106) E. W. HOPKINS, W. H. PETERSON en E. B. FRED, J. Am. Chem. Soc. 52-3659-1930. Composition of the gum, produced by root nodule bacteria. — (107) J. HOUBEN, Die Methoden der organischen Chemie, 3. Aufl. 3-254-1930.

(108) M. ISHIDATE, J. Pharmac. Soc. Jap. 49-56-1929, cit. n. Chem. Zentr. 1929, II, p. 423.

(109) M. JAFFÉ, Z. physiol. Chem. 2-47-1879. Zur Kenntnis der synthetischen Vorgänge im Tierkörper. — (110) Idem, 43-374-1904. Über das Verhalten des p-Dimethylaminobenzaldehyds im tierischen Stoffwechsel. — (111) A. JOLLES, Biochem. Z. 34-242-1911. Über eine neue Bildungsweise der Glucuronsäure.

(112) L. KALB en F. v. KALKENHAUSEN, Ber. 60-2514-1927. Über die Oxydation von Cellulose in Lösung (I Mitt.). — (113) P. KARRER, H. SALOMON, M. MORF en K. SCHÖPP, Biochem. Z. 258-4-1933. Zur Kenntnis des antiskorbutischen Vitamins (Vitamin C, Ascorbinsäure). — (114) P. KARRER, G. SCHWARZENBACH en K. SCHÖPP, Helv. Chim. Acta. 16-181-1933. Zur Kenntnis des antiskorbutischen Vitamins (Vitamin C). — (115) Idem, 16-302-1933. Über Vitamin C. — (116) H. KAUFMANN en C. FUCHS, Ber. 56-2527-1923. Die Saponine der Sarsaparille-Wurzel. — (117) J. KIERNMAYER, Chem. Ztg. 19-1003-1895. Über ein Furfurolderivat aus Lävulose. — (118). H. KILIANI, Ber. 54-456-1921. Neues aus der Zuckerchemie, I. Mitt. — (119) Ber. 58-2344-1925. Idem, VI. Mitt. — (120) Ber. 59-1469-1926. Idem, VII. Mitt. — (121) Ber. 65-1269-1932. Elektrolytische Gewinnung von d-Galaktonsäure. — (121a) F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT, Kon. Akad. v. Wetensch. (Proc.) 34-1411-1931. Über die Chemie des Wuchsstoffs. — (121b) F. KÖGL, Naturwiss. 21-17-1933. Die Chemie des Auxins und sein Vorkommen im Pflanzen- und Tierreich. — (122) S. KOMATSU en Y. SASAOKA, Chem. Zentr. 1927, I, p. 2656. — (123) A. KREFTING, Journ. Soc. Chem. Ind. 15-720-1896, (pat.) Seaweed, an improved method of treating, to obtain valuable product (alginic acid, „tang acid“), therefrom. — (124) 17-846-1898. (pat.) Seaweed (alginic acid), an improved system or apparatus for treating for the manufacture of products there from. — (125) E. KÜLZ, Arch. f. d. ges. Physiol. 30-485-1883. — (126) Z. f. Biologie 27-247-1890. — (127) S. KUWATA, J. pharmac. Soc. Jap. 49-99-1929, cit. n. Chem. Zentr. 1929, II, p. 1929. — (128) 51-7-1931, cit. n. Chem. Zentr. 1931, I, p. 2491. — (129) H. KYLIN, Z. physiol. Chem. 83-171-1913. Zur Biochemie des Meeresalgen. — (130) Idem, 94-409-1915. Untersuchungen über die Biochemie des Meeresalgen.

(131) F. B. LA FORGE, Ind. Eng. Chem. 15-499-1923. Furfural from corncobs. I. Factors influencing the furfural yield in the steam-digestion process. — (132) F. B. LA FORGE en G. H. MAINS, Ind. Eng. Chem. 15-823-1923. Furfural from corncobs. — (133) K. LEFÈVRE en B. TOLLENS, Ber. 40-4513-1907. Untersuchungen über die Glucuronsäure, ihre quantitative Bestimmung und ihre Farbenreaktionen. — (134) P. A. LEVENE, Biochem. Z. 16-399-1909. Über die gepaarten Phosphorsäuren in Pflanzensamen. — (135) P. A. LEVENE en F. B. LA FORGE, J. Biol. Chem. 18-123-1914. On chondroitin-sulphuric acid. — (136) P. A. LEVENE en G. M. MEYER, J. Biol. Chem. 60-173-1924. Structure of diacetoneglucose. II. 3-Methyl-glucuronic acid and 4-methylgluco-heptonic-lactone. — (137) P. A. LEVENE en L. LOPEZ SUAREZ, J. Biol. Chem. 36-105-1918. Mucins and mucoids. — (138) V. E. LEVINE en E. RICHMAN, J. Biol. Chem. 101-373-1933. The antimony-trichloride reaction with compounds containing five membered mono-hetero-cyclic rings. — (139) F. V. LINGGOOD, Biochem. J. 24-262-1930. The decarboxylation of pectin. — (140) K. P. LINK en A. D. DICKSON, J. Biol. Chem. 86-491-1930. The preparation of d-galacturonic acid from lemon pectic acid. — (141) K. P. LINK en C. NIEMANN, J. Am. Chem. Soc. 52-2474-1930. The action of weak mineral acids on uronic acids. — (142) K. P. LINK en R. NEDDEN, J. Biol. Chem. 94-307-1931. Improvements in the preparation of d-galacturonic acid. — (143) Science 76-386-1932. Crystalline d-mannuronic acid. — (144) K. P. LINK, B. BURKHART en L. BAUR, J. Biol. Chem. 104-171-1934. A micromethod for the determination of uronic acids. — (145) H. J. v. LUTSIBURG MAAS en G. v. ITERSON Jr., Versl. Kon. Akad. v. Wetensch., Afd. Nat. 24-251-1915. Een microsaccharimeter.

(146) A. MAGNUS-LEVY, *Biochem. Z.* 2-319-1906. Über Paarung der Glucuronsäure mit optischen Antipoden. — (147) *Biochem. Z.* 6-502-1907. Über das Auftreten einer Benzoesäure-Glucuronsäureverbindung im Hammelharn nach Benzoesäurefütterung. — (148) A. MANDEL en C. NEUBERG, *Biochem. Z.* 13-148-1908. Naphtoresorcin als Reagens auf einige Aldehyd- und Ketosäuren. — (149) F. MANN en B. TOLLENS, *Ann.* 290-155-1896. Über die Bildung von Furfurol und Kohlensäure aus Glucuronsäure. — (150) R. H. F. MANSKE, *J. Biol. Chem.* 86-571-1930. The occurrence of d-mannose in seaweed and the separation of l-fucose and d-mannose. — (151) J. MARCUSSON, *Z. angew. Chem.* 40-1104-1927. Die chemische Aufbau der Braunkohlen. — (152) MATSUNAMI, *J. pharmac. Soc. Jap.* 47-87-1927, cit. n. *Chem. Zentr.* 1927, II, p. 1840. — (153) K. MAURER en B. SCHIEDT, *Ber.* 65-1054-1933. Die Darstellung einer Säure $C_6H_8O_6$ aus Glucose, die in ihrer Reduktionskraft der Ascorbinsäure gleicht. — (154) P. MAYER en C. NEUBERG, *Z. physiol. Chem.* 29-256-1900. Über den Nachweis gepaarten Glucuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn. — (155) Idem, *Z. physiol. Chem.* 32-518-1901. Über ein bisher unbekanntes reduzierende Substanz des Blutes. — (156) Idem, *Biochem. Z.* 9-439-1908. Über asymmetrische Glucuronsäurepaarung. — (157) R. B. MC. KINNIS, *J. Am. Chem. Soc.* 50-1911-1928. An investigation of the hypothetical combined pentose and the so-called free pentose with inferences on the composition of pectin. — (158) K. H. MEYER en H. MARK, *Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe* (1930). — (159) F. MICHEEL en K. KRAFT, *Z. physiol. Chem.* 215-215-1933. Die Konstitution des Vitamins C. — (160) Idem, 216-233-1933. Die Konstitution des Vitamins C. — (161), Idem, 218-280-1933. Die Konstitution des Vitamins C. *V. Mitt.* — (162) *Nature* 131-274-1933. Constitution of vitamin C. — (163) T. MIWA, *Science reports of the Tokyo Bunrika Daigaku* 1-23-1932. Zur Kenntnis der Alginsäure I. — (164) MOLISCH en GOLDSCHMIEDT, *Monatsh.* 22-679-1901, cit. n. *Chem. Zentr.* 1901, II, p. 1078. — (165) F. MOORE en S. N. RAY, *Nature* 130-997-1932. Vitamin C and hexuronic acid. — (166) A. MÜTHER en B. TOLLENS, *Ber.* 37-298-1904. Hydrolyse von Seetang, *Fucus*, *Laminaria* und *Carrageemoos*.

(167) D. NANJI, F. PATON en A. LING, *J. Soc. Chem. Ind.* 44-253T-1925. Decarboxylation of polysaccharide acids; its application to the establishment of the constitution of pectins and to their determination. — (168) W. L. NELSON en L. H. CRETCHER, *Science* 67-537-1928. A new type of acid carbohydrate from seaweed. — (169) *J. Am. Chem. Soc.* 51-1914-1929. The alginic acid from *Macrocystis pyrifera*. — (170) Idem, 52-2130-1930. The isolation and identification of d-mannuronic acid lactone from *Macrocystis pyrifera*. — (171) Idem, 54-3409-1932. The properties of d-mannuronic acid lactone. — (172) C. NEUBERG, *Ber.* 33-2252-1900. Über die Harnpentose, ein optisch inactives natürlich vorkommendes Kohlenhydrats. — (173) *Ber.* 33-3315-1900. Zur Kenntnis der Glucuronsäure. I. — (174) C. NEUBERG en J. WOHLGEMUTH, *Z. physiol. Chem.* 35-31-1902. Über d-Arabinose, d-Arabonsäure und die quantitative Bestimmung von Arabinose. — (175) C. NEUBERG en E. SALKOWSKI, *Z. physiol. Chem.* 36-261-1902. Die Verwandlung von d-Glucuronsäure in l-Xylose. — (176) C. NEUBERG, Asher und Spiro. *Ergebn. d. Physiologie* 3-428-1904. Die Physiologie der Glucuronsäure. — (177) C. NEUBERG en W. NEIMANN, *Z. physiol. Chem.* 44-97-1905. Neue Reaktionen und Derivate der Glucuronsäure. VII. Mitteilung über Glucuronsäure. — (178) C. NEUBERG, *Biochem. Z.* 16-406-1909. Notiz über Phytin. — (179) C. NEUBERG en S. LACHMANN, *Biochem. Z.* 24-416-1910. Über ein neues Verfahren zur Gewinnung von Glucuronsäure (und Mentholglucuronsäure). — (180) C. NEUBERG, *Der Harn*. Berlin 1911, p. 249. — (181) Idem, p. 436. — (182) C. NEUBERG en S. SANEYOSHI, *Biochem. Z.* 36-56-1911. Über den Nachweis kleiner Mengen Glucuronsäure als Osazon. — (183) C. NEUBERG en M. KOBEL, *Biochem. Z.* 243-435-1931. Über die

Ausführung der Reaktion von Alduronsäuren mit Naphtoresorcin. — (184) I. S. NEUBERG en H. COLLATZ, *Biochem. Z.* 255-27-1932. Über ein einfaches Verfahren der Gewinnung von Zuckern aus ihren Hydrazonen. — (185) C. NIEMANN en K. P. LINK, *J. Biol. Chem.* 95-203-1932. Synthesis of the hexuronic acids. I. The synthesis of d-l-galacturonic acid from mucic acid. — (186) Idem¹⁾, 101-338-1933. Substituted hydrazine derivatives of the hexuronic acids. Phenylhydrazine- and p-bromophenylhydrazine-derivatives of d-galacturonic acid and p-bromophenylhydrazine derivatives of d-mannuronic acid. — (187) Idem, 104-195-1934. Synthesis of the hexuronic acids. IV. The synthesis of d-galacturonic acid from d-galactose.

(188) M. H. O'DWYER, *Biochem. J.* 20-656-1926. The hemicelluloses. IV. The hemicelluloses of beech wood. — (189) Idem, 22-381-1928. Preliminary investigations on the constitution of the hemicelluloses of timber. — (190) A. OGATO en T. YAMAUTI, *Chem. Zentr.* 1929, II, p. 1567. — (190a) H. OHLE en G. BEREND, *Ber.* 58-2585-1925. Über die Acetonverbindungen der Zucker und ihre Derivate. IV. Die Konstitution der Diaceton-galactose. — (191) H. OHLE, H. ERLBACH en H. CARLS, *Ber.* 67-324-1934. d-Glucosaccharosäure, ein Isomeres der Ascorbinsäure.

(192) C. PADERI, *Chem. Zentr.* 1911, II, p. 1370. — (193) W. PALLADIN en W. LEWTSCHENKO, *Chem. Zentr.* 1925, I, p. 2630. — (194) J. PATTERSON, *J. Chem. Soc.* 123-1139-1923. Investigations of the mannan present in vegetable ivory. — (195) H. PRINGSHEIM, *Zuckerchemie* 1925, p. 26. — (196) J. PRYDE en R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* 27-1197-1933. The biochemistry and physiology of glucuronic acid. I. The structure of glucuronic acid of animal origin. — (197) R. PUMMERER en W. GUMP, *Ber.* 56-1001-1923. Über die Aufspaltung des Furfuralkohols und den Mechanismus der Lävulinsäure-Bildung aus Hexosen.

(198) A. J. QUICK, *J. Biol. Chem.* 61-679-1924. The synthesis of mentholglucuronic acid in the rabbit. — (199) Idem, 67-477-1926. The study of benzoic acid conjugation in the dog with a direct quantitative method for hippuric acid. — (200) Idem, 69-549-1926. The preparation and study of β -d-glucuronic acid monobenzoate (benzoylglucuronic acid). — (201) Idem, 74-331-1927. The preparation of borneolglucuronic acid and glucuronic acid. — (202) Idem, 77-581-1928. Quantitative studies of β -oxydation. I. The conjugation of benzoic acid and phenylacetic acid formed as the endproducts from the oxydation of phenylsubstituted aliphatic acids.

(203) K. REHORST, *Ber.* 62-519-1929. Über das Saponin der Zuckerrübe. — (204) T. REICHSTEIN, A. GRÜSSNER en R. OPPENAUER, *Helv. Chim. Acta.* 16-561-1933. Synthese der d- und l-Ascorbinsäure (Vitamine). — (205) *Nature* 132-280-1933. Synthesis of d- and l-ascorbic acid. — (206) *Helv. Chim. Acta* 16-1019-1933. Synthese der d- und l-Ascorbinsäure. — (207) L. ROSENTHALER, *Der Nachweis organischer Verbindungen.* Stuttgart 1914, p. 345. — (208) p. 346. — (209) M. RUBNER, *Ber.* 18-480-1885. (Ref.) Über die Einwirkung von Bleiacetat auf Trauben- und Milchsucker. — (210) O. RUFF en G. OLLENDORFF, *Ber.* 33-1798-1900. Abbau von d-Galactose und von Milchsucker (d-Lyxose und Galacto-arabinose). — (211) W. RUZICKA en M. HÖNIG, *Ber.* 62-1434-1929. Zur Darstellung von d-Glucon- und Galactonsäure.

(212) L. SANDS en R. KLAAS, *J. Am. Chem. Soc.* 51-3441-1929. The composition of chollagum. I. The isolation of l-arabinose, d-galactose and l-rhamnose. — (213) Y. SASAOKA, *Chem. Zentr.* 1931, I, p. 3692. — (214) G. SCHEFF, *Biochem. Z.* 194-96-1928. Über die Reduktionsfähigkeit chemisch reiner Glucuronsäure. — (215) A. L. v. SCHERPENBERG, *Diss.* Delft 1918. Onderzoekingen naar de constitutie van het euxan-

¹⁾ en E. SCHOEFFEL.

thoegen, de moederstof van het Indisch geel. — (216) O. SCHMIEDEBERG en H. MEYER, Z. physiol. Chem. 3-422-1879. Über Stoffwechselprodukte nach Campherfütterung. — (217)¹⁾ Arch. Exp. Path. 28-354-1891, cit. n. C. OPPENHEIMER, Handb. d. Biochemie d. Menschen u. d. Tiere 1924, I, p. 552. Über die chemische Zusammensetzung des Knorpels. — (218) Tagebl. d. 58. Versamml. dtsh. Naturforscher u. Ärzte in Strassburg 1885, p. 427. (cit. n. H. Kylin, 1915). — (219) O. SCHMIDT en O. HESSE, Ann. 119-102-1861. Notiz über Phloretin. — (220) F. SCHMID, C. r. soc. de biologie 86-612, cit. n. Chem. Zentr. 1922, II, p. 1243. — (221) E. SCHMIDT, W. HAAG en L. SPERLING, Ber. 58-1397-1925. Zur Kenntnis pflanzlicher Inkrusten. VI. — (222) E. SCHMIDT en F. VOCKE, Ber. 59-1585-1926. Zur Kenntnis der Polyglucuronsäuren. — (223) E. SCHOEFFEL en K. P. LINK, J. Biol. Chem. 95-213-1932. The preparation of d-mannuronic acid lactone. — (224) Idem, 100-397-1933. Isolation of α - and β -d-mannuronic acid. — (225) C. G. SCHWALBE en G. A. FELDTMANN, Ber. 58-1534-1925 Über ein Vorkommen von d-Glucuronsäure in pflanzlichen Faserstoffen. — (226) K. SHIBATA, S. IWATA en M. NAKAMURA, Acta Phytochimica 1-106-1922. Untersuchungen über das Baicalin, eine Flavon-Glucuronsäure-Verbindung aus den Wurzeln von *Scutellaria Baicalensis*. — (227) A. C. SLOEP, Diss. Delft 1928. Onderzoekingen over pectinstoffen en hare enzymatische ontleding, p. 47. — (228) p. 54. — (229) p. 56. — (230) p. 61. — (231) p. 80. — (232) p. 87. — (232a) K. SMOLENSKI, Z. Physiol. Chem. 71-266-1911. Über eine gepaarte Glucuronsäure der Zuckerrübe. — (233) Chem. Zentr. 1924, II, p. 317. — (234) A. SPIEGEL, Ber. 15-1964-1882. Über die Euxanthinsäure. — (235) A. D. STAMMERS, Chem. Zentr. 1927, II, p. 277. — (236) E. C. STANFORD, Chem. News 47-254-1883. On algin, a new substance, obtained from some commoner species of marine algae. — (237) W. STEPP, Z. Physiol. Chem. 107-264-1919. Über das Vorkommen von Glucuronsäure im menschlichen Blute. — (238) W. STEPP en E. DIEBSCHLAG, Chem. Zentr. 1921, III, p. 192. — (239) M. L. SUAREZ, Chem. Ztg. 41-87-1917. Ein Isomeres der Glucuronsäure. — (240) C. O'SULLIVAN, J. Chem. Soc. 45-41-1884. — (241) Idem, 79-1164-1901. — (242) A. SZENT-GYÖRGYI, Biochem. Z. 181-433-1927. Zellatmung. VI. Zur Funktion der Nebennierenrinde und über die Substanz C XII. — (243) Biochem. J. 22-1399-1928. Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Description of a new carbohydrate derivative. — (244) A. SZENT-GYÖRGYI en J. L. SVIRBELY, Nature 129-576-1932. Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. — (245) Nature 129-690-1932. Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. — (246) Biochem. J. 26-865-1932. The chemical nature of vitamin C. — (247) Idem, 27-279-1933. The chemical nature of vitamin C. — (248) A. SZENT-GYÖRGYI en W. N. HAWORTH, Nature 131-24-1933. Hexuronic acid as the antiscorbutic factor.

(249) H. THIERFELDER, Z. physiol. Chem. 11-390-1887. Untersuchungen über die Glucuronsäure. — (250) Idem, 13-275-1889. Untersuchungen über die Glucuronsäure. — (251) Idem, 15-71-1891. Über die Reduktion der Glucuronsäure durch Natriumamalgam. — (252) J. TILLMANS, P. HIRSCH en REINSHAGEN, Z. f. Nahrgrs. u. Genussm. 56-272-1928, cit. n. G. Klein, Handb. d. Pflanzenanalyse 1933, IV, p. 1081. — (253) Biochem. Z. 250-312-1932. Über das Vitamin C. — (253a) B. TOLLENS, Handb. der Kohlenhydrate, 1895, II, p. 60. — (254) Ber. 34-1434-1901. Über Cellulose, Oxycellulose, Hydrocellulose, die Pektinkörper, sowie Tragacanth. — (254a) Ber. 41-1788-1908. Über einen einfachen Nachweis der Glucuronsäure mittels Naphtoresorcin, Salzsäure und Äther. — (255) C. TOLLENS, Z. physiol. Chem. 67-141-1910. Über Glucuronsäure und Ätherschwefelsäure im menschlichen Urin. — (257) A. TSCHIRCH en H. CEDERBERG, Arch. Pharm. 245-97-1907. Über das Glycyrrhizin. — (258) A.

¹⁾ O. SCHMIEDEBERG.

TSCHIRCH en S. GAUCHMANN, Arch. Pharm. 246-545-1908. Weitere Untersuchungen über die Glycyrrhizinsäure. — (259) Idem, 247-121-1909. Weitere Untersuchungen über das Glycyrrhizin.

(260) H. URBAN, Cellulosechemie 7-75-1926. Zur Kenntnis des Fichtenholzes.

(261) S. VEIBEL, Biochem. Z. 232-435-1931. Über die Methylglyoxalyl-essigsäure und ihre Dismutation durch Bacterium coli. — (262) H. VOGEL en A. GEORG, Tabellen der Zucker u. ihrer Derivaten. Berlin 1931.

(263) M. R. A. WEERMAN, Rec. trav. chim. 37-16-1917. L'action de l'hypochlorite de sodium sur les amides d' α -hydroxy-acides et de polyhydroxy-acides, ayant un groupe hydroxyle à la place α . — (264) F. WEINMANN, Ber. 62-1637-1929. Darstellung von d-Glucuronsäure aus Arabischen Gummi. — (265) Biochem. Z. 236-87-1931. Zur Kenntnis pflanzlicher Gummiarten. — (265a) G. H. v. D. WEY, Rec. trav. bot. néerl. 29-381-1932. Der Mechanismus des Wuchsstofftransportes. — (266) N. WILLE, cit. n. G. KLEIN, Handb. d. Pflanzenanalyse III (1), p. 269. — (267) A. WINDAUS, F. HAMPE en H. RABE, Z. physiol. Chem. 160-301-1926. Über das Sapogenin der Quillajasäure. — (268) E. WINTERSTEIN en G. TRIER, Die Alkaloïde, Berlin 1910. — (269) C. v. WISSELINGH, Pringsh. Jhrb. 31-619-1898. Microchemische Untersuchungen über die Zellwände der Fungi. — (270) A. WOHL en K. v. NIESSEN, Dtsch. Ztschr. f. Rübenzuckerind. 26-924-1889. — (271) L. WOLFF, Ann. 229-266-1885. Über einige Abkömmlinge der Lävulinsäure. — (272) Idem, 260-79-1890. Über Glyoxylpropionsäure und einige Abkömmlinge derselben.

STELLINGEN.

I.

De onderstelling is gewettigd, dat de pentosen in de planten over de hexuronzuren uit de hexosen ontstaan.

II.

De door TH. J. D. ERLEE, voor het verband tusschen reinheidsquotiënt, centrifugeertijd en aantal omwentelingen, voor het centrifugeeren van suikers gewijzigde formule van H. v. WARTENBERG en H. PERTZEL is onjuist; dit blijkt uit het feit, dat ERLEE's formule in strijd is met de uitkomsten van J. BERGÉ.

TH. J. D. ERLEE, Arch. v. d. suikerind. in Ned. Ind. 39-10-41-1931.

J. BERGÉ, La Sucrierie Belge, 1927, p. 211.

III.

Het kwalitatief aantoonen van melkzuur met yttriumzouten verdient de voorkeur boven het aantoonen van het zuur met zinkzouten.

BEHRENS-KLEY, Mikrochem. Analyse, 1915 I, p. 123.

BEHRENS-KLEY, Org. mikrochem. Analyse, 1922 II, p. 337.

IV.

F. EHRLICH heeft niet bewezen, dat in de pectinestoffen, zooals deze in de planten voorkomen, polygalacturonzuur als de tetraverbinding aanwezig is.

F. EHRLICH en F. SCHUBERT, Ber. 62-1974-1929.

F. EHRLICH, Biochem. Z. 250-525-1932.

V.

Lignine in de planten ontstaat uit pectine.

VI.

De ageing-test geeft, op zichzelf, geen aanwijzing voor de duurzaamheid van de vezels in papier.

R. H. RASCH, U. S. Department of Commerce, Bureau of Standards No. 107 (1929) en No. 352 (1931).

VII.

T. TAKAHASHI heeft niet bewezen, dat, bij inwerking van Bacterium Hoshigaki var. glucuronicum op glucose, het l-glucuronzuur gevormd wordt.

T. TAKAHASHI en T. ASAI, Zentralbl. f. Bact. u. Parasitenk. 84-193-1931.

VIII.

Bij de mangaanbepaling, als pyrofosfaat, behoeft niet van een Goochsche asbestfilter gebruik gemaakt te worden, doch kan met een papieren filter volstaan worden.

F. P. TREADWELL, Lehrb. d. analyt. Chem., 1923, II, p. 106.

IX.

De reactie van C. MÄULE op lignine met kaliumpermanganaat, zoutzuur en vervolgens ammoniak is dezelfde, als de reactie van A. PAYEN en E. UNGAR op lignine met chloor en ammoniak.

V. GRAFE, Monatsh. f. Chem. 25-1025-1904.

W. FUCHS, Die Chemie des Lignins, 1926, p. 95.

X.

In de publicatie van S. E. SHEPPARD over de titratiekrommen van verschillende reduceerende verbindingen komen enkele onjuistheden voor.

S. E. SHEPPARD, Trans. Am. El. Soc. 39-429-1921.

XI.

De electropieverschijnselen kunnen evengoed door een pH-verandering, als door een statische ontlading verklaard worden.

L. KARZAG, Handb. d. Biol. Arbeitsmeth. 1928, Abt. V, Tl. II, p. 831.

XII.

Het begrip humus omvat een groep stoffen van zeer heterogene samenstellingen.

Het verdient aanbeveling het begrip humus te begrenzen tot een groep van verbindingen met verwante samenstellingen.

XIII.

De methode van G. SPACU en P. SPACU, om kleine hoeveelheden bismuth kwantitatief te bepalen met een complexe cobaltverbinding, heeft voordeelen boven de andere bekende methoden.

G. SPACU en P. SPACU, Z. anal. Chem. 93-260-1933.

XIV.

Er kunnen tegen de, tegenwoordig vrijwel algemeen aanvaarde, formule van E. L. HIRST voor de constitutie van vitamine C verschillende bezwaren gemaakt worden.

E. L. HIRST, J. Soc. Chem. Ind. 52-221-1933.
