

RUDOLF TSCHESCHE und DIETER FORSTMANN

Über Triterpene, IV¹⁾

MUSENNIN, EIN WURMWIRKSAMES SAPONIN
AUS DER RINDE VON *ALBIZZIA ANTHELMINTICA*

Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg
(Eingegangen am 18. Juli 1957)

Musenin, der anthelmintische Inhaltsstoff der Rinde von *Albizzia anthelmintica* (Brongn.) wurde rein, aber nicht kristallisiert erhalten und als Echinocystsäure-tetrasaccharid erkannt. Als Zucker wurden 1 D-Glucose und 3 L-Arabinose gefunden, ferner wurde bei der sauren Hydrolyse ein Trisaccharid aus 2 Arabinose und 1 Glucose in Form des Methylglykosides neben einem weiteren Oligosaccharid isoliert. Es wurde die Verknüpfung der Zucker untereinander und mit dem Aglykon bestimmt und dadurch ein Konstitutionsvorschlag für das Saponin ermöglicht.

Die Rinde des afrikanischen Baumes *Albizzia anthelmintica* (Brongn.), zur Familie der Leguminosen zählend, wird in weiten Teilen Afrikas als gut wirksames Bandwurmmittel verwendet. Namen wie Mesenna, Mousena, Besena und Abusena scheinen im wesentlichen die gleiche Droge zu bezeichnen²⁾. Ihre Anwendung erfolgt im allgemeinen durch Einnehmen der gepulverten Rinde, auch ein daraus bereiteter Aufguß scheint noch gut wirksam zu sein³⁾. Über den wirksamen Inhaltsstoff ist bisher wenig bekannt, nur daß die Rinde Saponine enthält, ist von mehreren Autoren⁴⁾ berichtet worden.

Zur Isolierung des Wirkstoffes ^{*)} bedienten wir uns des Enchyträentestes nach H.-A. OELKERS⁵⁾, der die Geschwindigkeit des Absterbens von *Enchyträus albidus* in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt. Dieses Verfahren hatte sich auch bei der Auswertung von Filix-Präparaten bewährt ^{**)}. Es gelang mit seiner Hilfe, den wirksamen Inhaltsstoff der Rinde rein zu gewinnen. Für den Wirkstoff wollen wir die zuerst von THEIL⁴⁾ verwendete Bezeichnung *Musenin* beibehalten.

Zur Extraktion des Musennins verweisen wir auf den experimentellen Teil. Eine weitere Anreicherung des Wirkstoffes wurde zunächst durch Chromatographie an neutralem Aluminiumoxyd versucht, wobei wassergesättigtes Butanol als Lösungsmittel verwendet wurde. Dadurch gelang die Auftrennung in 3 Fraktionen, von denen nur die am stärksten an Alu-

¹⁾ III. Mitteil.: R. TSCHESCHE, A. HEESCH und R. FUGMANN, Chem. Ber. 86, 626 [1953].

²⁾ R. O. BALLY, Heil- und Giftpflanzen der Eingeborenen von Tanganjika, Berlin-Dahlem 1938, S. 39.

³⁾ Privatmitteil. von Dr. J. SEEGERT, Windhuk.

⁴⁾ J. M. WATT und M. G. BREYER-BRANDWIJK, The Medicinal and Poisonous Plants of South Africa, E. L. S. Livingstone, Edinburgh 1932, S. 63.

^{*)} Wir möchten Herrn Dr. J. SEEGERT, Windhuk, auch hier unseren Dank für die Beschaffung der Rinde von *Albizzia anthelmintica* ausdrücken.

⁵⁾ Arzneimittelforsch. 3, 625 [1953].

^{**)} Die Versuche mit Enchyträen wurden von Herrn Dr. H. MENDHEIM, München, durchgeführt, dem auch hier für seine Bemühungen ganz besonders gedankt sei.

miniumoxyd haftende Fraktion sich im Enchyträentest als wirksam erwies. Die beiden anderen Fraktionen lieferten Kristallisate, von denen das eine sich als ein Pflanzensterin vom Schmp. 150–155° erwies (vermutlich ein Gemisch), während das zweite ein Phytosterolin der vermutlichen Zusammensetzung $C_{34}H_{60}O_6$ darstellt. Es konnte mit dem Enzympräparat Luizym in Glucose und ein Sterin zerlegt werden, letzteres stimmte weitgehend mit dem Sterin der ersten Fraktion überein und ließ sich mit Digitonin fällen. Das Sterin wurde nicht weiter untersucht. Die den gesuchten Wirkstoff enthaltende Fraktion kristallisierte nicht und hatte im Enchyträentest eine Wirksamkeit von 10 mg %. Eine weitere Auftrennung durch Chromatographie an Cellulosepulver oder an Hyflo Super-Cel gelang nicht. Das Konzentrat war danach farblos.

Die Beobachtung, daß wäßrige Lösungen des Wirkstoffes auf Zusatz von Äther oder Toluol beim Umschütteln starke Fällungen lieferten, aus denen beim Trocknen i. Vak. bei 50° das Lösungsmittel leicht ohne Veränderung des Wirkstoffes entfernt werden konnte, führte schließlich zu einer wesentlich vereinfachten Isolierung. Die Lösung des Chloroform/Äthanol-Extraktes in Wasser wurde unter Umschütteln mit Äther versetzt und die entstandene Fällung nach mehrstündigem Stehenlassen abzentrifugiert. Die Fällung enthielt noch etwas an stark färbenden Bestandteilen, die aber durch Verteilung in dem System Chloroform/Methanol/Wasser (10:10:7) leicht entfernt werden konnten. Die Verunreinigungen gingen bei zweimaliger Verteilung fast vollkommen in die schwere Phase über. Die Wirksamkeit des so erhaltenen farblosen Produktes entsprach derjenigen des durch Chromatographie erhaltenen Materials. Die Ausbeute betrug 0.84 % der getrockneten Rinde.

Die Eigenschaften des Wirkstoffes, der auf keine Weise kristallisiert erhalten werden konnte, deuteten auf ein Saponin der Triterpenreihe mit saurem Aglykon hin. Die Lösungen in Wasser zeigten ein p_H von 5. Noch größer als in Wasser war die Löslichkeit in verd. Laugen. Beim Ansäuern der Lösung trat Ausfällung ein. Die Farbreaktionen der Triterpene mit Zinntetrachlorid in Eisessig/Tetrachlorkohlenstoff sowie mit Thionylchlorid und Antimontrichlorid fielen positiv (rotviolette Färbung) aus^{6,7)}. Beim Schütteln der wäßrigen Lösung entstand ein stabiler Schaum. Das IR-Spektrum zeigte die Bande einer Carboxylgruppe und einer Doppelbindung, weiter ließ sich aus ihm die glykosidische Natur als wahrscheinlich entnehmen. Musennin bildet mit Cholesterin eine in Wasser schwer lösliche Molekelverbindung, wie sich aus der Beobachtung ergibt, daß eine auf Papier gelegte Cholesterinschranke von einer aufsteigenden Lösung des Saponins nicht durchbrochen wird⁸⁾. In Äthanol konnte jedoch kein Niederschlag erhalten werden. Vermutlich liegt Musennin in der Rinde schon als Molekelverbindung mit dem nachgewiesenen Phytosterin vor.

Bei der Hydrolyse mit methanol. Salzsäure wurden ca. 45 % Aglykonanteil und als Zucker D-Glucose und L-Arabinose erhalten. Die Glucose wurde als *p*-Nitranilind-glucosid identifiziert⁹⁾, die Arabinose als α -Methylglykosid, nachdem die Zucker zuvor durch Verteilungschromatographie an Cellulosepulver getrennt worden waren. Daneben wurde in kleiner Menge noch das Methylglykosid eines Trisaccharids

⁶⁾ C. R. NOLLER und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. **64**, 3047 [1942].

⁷⁾ J. J. SCHEIDEGGER und E. CHERBULIEZ, Helv. chim. Acta **38**, 547 [1955].

⁸⁾ L. KOFLER, R. FISCHER und M. NEWESLY, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. **267**, 685 [1929].

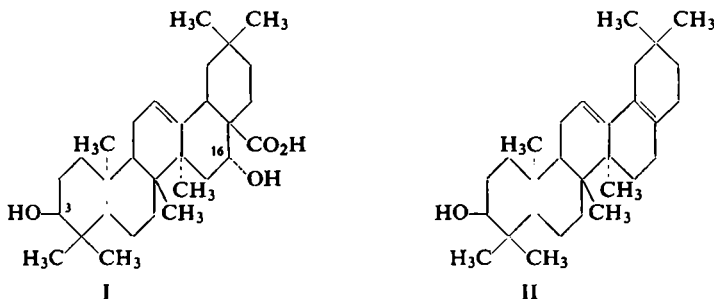
⁹⁾ F. WEYGAND, W. PERKOW und P. KUHNER, Chem. Ber. **84**, 594 [1951].

$C_{17}H_{30}O_{14}$ erhalten, das als Zucker 2 L-Arabinose und 1 D-Glucose aufwies. Ein weiteres Zuckerderivat ist reduzierend und leitet sich vermutlich auch von einem Trisaccharid ab, das Arabinose und Glucose im Verhältnis 2:1 enthält; die Analyse deutet auf eine Anhydroverbindung davon hin. Seine Ausbeute war zu gering, um eine Konstitutionsbestimmung durchführen zu können.

Das Aglykon konnte als solches zunächst nicht kristallisiert werden, es wurde daher mit Diazomethan in den Methylester und mit Acetanhydrid und Pyridin in das Esterdiacetat übergeführt. Nach Chromatographie an Aluminiumoxyd kristallisierte diese Verbindung. Durch Verseifung mit methanolischer Kalilauge ließ sich daraus der kristallisierte Methylester gewinnen. Die Konstanten dieser Verbindungen stimmten mit den Angaben der Literatur für Echinocystensäure-methylester $C_{31}H_{50}O_4$ und sein Diacetat $C_{35}H_{54}O_6$ überein. Später gelang es dann auf Grund einer Notiz von ELLIOTT und Mitarbb.¹⁰⁾, auch die Säure $C_{30}H_{48}O_4$ (I) durch Umkristallisieren aus Isopropylalkohol kristallisiert zu gewinnen. Es wurde auch noch der Diketoester durch Chromsäureoxydation hergestellt, der die erwarteten Eigenschaften zeigte¹¹⁾. Die nachfolgende Tabelle gibt die gefundenen Konstanten im Vergleich zu denen der Echinocystensäure wieder:

	Echinocystensäure		Sapogenin aus Musennin	
	Schmp.°	$[\alpha]_D$	Schmp.°	$[\alpha]_D$
Säure	305–312	+ 40.6°	305–310	+ 35.5°
Methylester	213–215 222	+ 31.4°	216–217	+ 33.0°
Esterdiacetat	200–201	– 15.1°	200–201	– 15.0°
Diketomethylester	166–168	+ 1.6°	165–167	–
Norechinocystadienol	192–195	+ 81.8°	183–186	–
Monoacetat	175–177 187–188	+ 46.0° + 66.0°	178–180	+ 42.0°

Außer durch saure Hydrolyse konnte das Aglykon des Musennins auch durch Pyrolyse bei 270–300° und Sublimation bei 10^{-2} Torr gewonnen werden. Hierbei entstand als Nebenprodukt in etwa 10-proz. Ausbeute ein Decarboxylierungs- und Dehydratisierungsprodukt der Echinocystensäure mit der Summenformel $C_{29}H_{46}O$ in Form eines Isomergemisches.



¹⁰⁾ D. F. ELLIOTT, G. A. R. KON und H. R. SOPER, *J. chem. Soc. [London]* **1940**, 612, 614, 616.

¹¹⁾ W. R. WHITE und C. R. NOLLER, *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 983 [1939].

Es war von der Echinocystsäure durch seine Löslichkeit in Petroläther leicht zu trennen. Nach mehrfachem Umkristallisieren konnte daraus Norechinocystadienol (II) mit annähernd den in der Literatur¹²⁾ angegebenen Konstanten gewonnen werden. Leichter ließ sich sein Monoacetat reinigen, das die beschriebenen Werte aufwies. Auch die IR-Spektren des Aglykons von Musennin und seiner Derivate stimmten gut mit den von früheren Bearbeitern erhaltenen Kurven der Echinocystsäure und ihrer Abkömmlinge überein.

Echinocystsäure wurde erstmals von I. BERGSTEINSSON und C. R. NOLLER¹³⁾ 1943 aus *Echinocystus fabacea* (Cucurbitaceae) als Aglykon eines in den Speicherwurzeln enthaltenen Saponins isoliert. Die bis zu 50 kg schweren Wurzeln von Echinocystusarten, speziell vom Typ fabaceae, sind als Fischgifte der Indianer des pazifischen Nordamerika bekannt geworden¹⁴⁾. Kürzlich haben REICHSTEIN und Mitarbb.¹⁵⁾ einen von ihnen als Substanz 752 beschriebenen Stoff aus den Samen verschiedener Strophanthusarten als Echinocystsäure erkannt. Die Konstitution dieser Triterpencarbonsäure wurde von D. FRAZIER und C. R. NOLLER¹⁶⁾, von O. JEGER, B. BISCHOF und L. RUZICKA¹⁷⁾, sowie von B. BISCHOF, O. JEGER und L. RUZICKA¹⁸⁾ geklärt.

Nach Bestimmung des Aglykons von Musennin als Echinocystsäure und der Zucker L-Arabinose und D-Glucose als Komponenten des Glykosids interessierte das Molekulargewicht. Es wurde durch potentiometrische Titration zu 1020 bzw. 1030 ermittelt, während sich für ein Tetrasaccharid aus diesen Bestandteilen (3 Arabinose, 1 Glucose und Echinocystsäure) ein Wert von 1030 errechnen würde. Dieser Befund wurde durch Acetylbestimmung des durchacetylierten Glykosids kontrolliert*), der Acetylwert wäre mit einem Mol.-Gew. von 1000 vereinbar.

Es blieb der Aufbau der Zuckerkette und die Art der Verknüpfung mit dem Aglykon zu klären. Die Auffindung eines Trisaccharid-methylglykosids zeigte, daß mindestens 3 Zucker direkt verbunden sein müssen. Für den 4. Zucker, eine Arabinose, blieben vorerst noch 3 verschiedene Möglichkeiten offen. Sie konnte als Verzweigung an das Trisaccharid gebunden sein oder die Zuckerkette um eine Molekel Arabinose verlängern, bzw. an die 2. Hydroxylgruppe der Echinocystsäure als alleiniger Zucker geknüpft sein. Zwischen diesen Möglichkeiten wurde auf folgende Weise entschieden:

Musennin wurde mit Silberoxyd und Methyljodid permethyliert¹⁹⁾. Nach Hydrolyse des durchmethylierten Saponins ließen sich 3 methylierte Zucker als Spaltstücke nachweisen. Ihre Trennung erfolgte durch Chromatographie an einer Carboraffin-Celite-Säule²⁰⁾, Methylzucker 1 (R_F 0.62), 2 (R_F 0.78), 3 (R_F 0.92). Durch papierchromatographischen Vergleich mit authentischer 2.3-, 2.4- und 2.5-Dimethyl-

¹²⁾ C. R. NOLLER und I. F. CARSON, J. Amer. chem. Soc. 63, 2238 [1941]; D. H. R. BARTON und C. J. W. BROOKS, J. chem. Soc. [London] 1951, 257, 261.

¹³⁾ J. Amer. chem. Soc. 56, 1403 [1934].

¹⁴⁾ K. PAECH und M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. III, S. 112, 1955, Verlag Springer Wien.

¹⁵⁾ D. H. R. BARTON, K. MOHR, T. REICHSTEIN und O. SCHINDLER, Helv. chim. Acta 39, 413 [1956]. ¹⁶⁾ J. Amer. chem. Soc. 66, 1267 [1944].

¹⁷⁾ Helv. chim. Acta 31, 1319 [1948].

¹⁸⁾ Helv. chim. Acta 32, 1911 [1949].

*) Wir möchten auch hier Herrn Dr. GRIMMER (in unserem Institut) für die von ihm durchgeführten Bestimmungen unseren ganz besonderen Dank sagen. Über die angewandte Methodik wird er selbst demnächst eine Arbeit veröffentlichen.

¹⁹⁾ R. KUHN, I. LÖW und H. TRISCHMANN, Chem. Ber. 88, 1502 [1955].

²⁰⁾ B. LINDBERG und B. WICKBERG, Acta chem. scand. 8, 569 [1954].

arabinose*) gelang es, Methylzucker 1 als 2.4-Dimethyl-arabinose zu identifizieren. Verbindung 2 konnte durch R_F -Wert, Färbung mit Anilinphthalat und Bestimmung der opt. Drehung als 2.3.4-Trimethyl-glucose erkannt werden. Das Vergleichsmaterial wurde in diesem Fall durch Hydrolyse permethylierter Raffinose erhalten. Methylzucker 3 erwies sich in Schmp., opt. Drehung und R_F -Wert als 2.3.4-Trimethyl-arabinose. Das Mengenverhältnis Dimethylarabinose zu Trimethylarabinose zu Trimethylglucose ergab sich aus der Intensität der Färbungen im Chromatogramm und vor allem aus der Menge der isolierten Spaltprodukte zu 2:1:1. Dieses Ergebnis wäre mit einer geraden Zuckerkette aus 4 Komponenten durchaus vereinbar.

Als Aglykon war bei der Hydrolyse des permethylierten Glykosids Echinocystsäuremethylester isoliert worden, was im Gegensatz zu vorstehendem Befund darauf hindeuten könnte, daß beide Hydroxylgruppen der Triterpencarbonsäure durch Zuckerreste verschlossen wären. Das dies nicht zutrifft, ergab die IR-Aufnahme des permethylierten Musennins (in CHCl_3 aufgenommen), die noch die Frequenz einer OH-Gruppe aufwies. Ferner gelang es zu zeigen, daß die Hydroxylgruppen des Echinocystsäuremethylesters unter den Bedingungen der Glykosidmethylierung nicht methyliert werden. Für die OH-Gruppe an C-16 (α) haben C. DJERASSI und Mitarbb.²¹⁾ aus dem Reaktionsverlauf der NaBH_4 -Reduktion des zugehörigen Ketons auf eine sterische Hinderung geschlossen, und auch das OH an C-3 (β) dürfte durch die benachbarten gem. CH_3 -Gruppen in seiner Reaktionsfähigkeit beeinträchtigt sein.

Herr Dr. G. GRIMMER²²⁾ fand durch quantitative Chromsäureoxydation des Musennins unter Bedingungen, bei denen der Zuckerteil der Molekel nicht angegriffen wird, daß eine OH-Gruppe der Echinocystsäure im Glykosid frei vorliegen muß, in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der IR-Aufnahme. Welche Hydroxylgruppe dafür in Frage kam, ließ sich auf folgendem Wege wahrscheinlich machen.

Wird Echinocystsäure mit Chromsäure in Eisessig oxydiert, so entsteht Norechinocystendion unter Decarboxylierung, da die gebildete β -Ketosäure nicht stabil ist. Wird Musennin unter analogen Bedingungen²²⁾ umgesetzt und das entstehende Oxydationsprodukt der Säurehydrolyse zur Abspaltung der Zucker unterworfen, so entsteht eine Säure. Es tritt also kein CO_2 -Verlust ein. Die gebildete Säure muß die 3-Dehydro-echinocystsäure sein, die schon von O. JEGER und Mitarbb.¹⁷⁾ hergestellt wurde, aber leider nicht kristallisiert erhalten werden konnte. Die saure Natur der Verbindung wurde von uns durch potentiometrische Titration gesichert, das IR-Spektrum zeigte die Carboxylbande bei 1663 cm^{-1} . Ferner ließ sich die Bande der Ketogruppe bei 1715 cm^{-1} erkennen.

Daraus kann geschlossen werden, daß im Musennin die Hydroxylgruppe an C-3 (β) frei vorliegen muß. *Diese Feststellung ist insofern bemerkenswert, als es bisher noch keine Triterpencarbonsäure-saponine gibt, bei denen ein anderes Hydroxyl als das an C-3 als Verknüpfungsort mit dem Zuckeranteil angenommen werden müßte*^{23, 24, 25)}.

*) Herrn Prof. F. SMITH, Minnesota, sind wir zu Dank verpflichtet für die Überlassung einiger Proben von 2.3-, 2.4- und 2.5-Dimethyl-arabinose bzw. von Derivaten dieser Verbindungen.

21) C. DJERASSI, G. H. THOMAS und H. MONSIMER, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3579 [1955].

22) G. GRIMMER, Angew. Chem. **69**, 400 [1957].

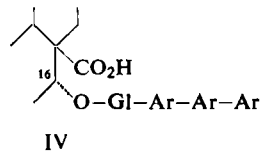
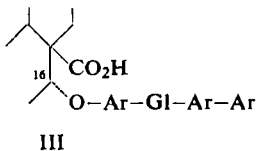
23) R. A. LAIDLAW, J. chem. Soc. [London] **1954**, 752.

24) R. H. FARMER und R. A. LAIDLAW, J. chem. Soc. [London] **1955**, 4201.

25) F. E. KING, J. A. BAKER und T. J. KING, J. chem. Soc. [London] **1955**, 1338.

Gestützt wird dieser Befund durch das IR-Spektrum. Die COOH-Bande ist von 1695 cm^{-1} in der Echinocystsäure auf 1646 cm^{-1} im Musennin verschoben (gemessen in KBr). Das könnte auf eine Chelatbindung zwischen Zuckerteil und Carboxylgruppe hindeuten, die aber nur verständlich wäre, wenn der Zuckeranteil des Saponins an die OH-Gruppe an C-16 (α) gebunden ist. Andererseits ist aber auch die COOH-Bande der 3-Keto-echinocystsäure gegenüber der Echinocystsäure (allerdings weniger) verschoben, so daß dieser Feststellung kein besonderes Gewicht zuerkannt werden darf. Die Frage der Verknüpfung der Zucker mit dem Aglykon über die Hydroxylgruppe an C-16 ist also nicht völlig gesichert, wenn auch wahrscheinlich²⁶⁾.

Damit müssen alle 4 Zucker direkt miteinander verknüpft sein. Um ihre Reihenfolge zu bestimmen, wurde das isolierte Trisaccharid-methylglykosid permethyliert und dann hydrolytisch gespalten. Als Spaltprodukte wurden 2.3.4-Trimethyl-arabinose, 2.4-Dimethyl-arabinose und 2.3.4-Trimethyl-glucose im Verhältnis 1:1:1 gefunden. Hieraus ergibt sich, daß im Trisaccharid die Arabinose endständig gebunden sein muß. Um zu entscheiden, welcher Zucker die Aldehydgruppe enthält, wurde das freie Trisaccharid mit Hypojodit oxydiert^{27, 28)}. Nach hydrolytischer Spaltung des Oxydationsproduktes konnte Glucose papierchromatographisch nicht mehr festgestellt werden. Somit ergibt sich für das Trisaccharid, für das wir den Namen *Musenose* vorschlagen, die Struktur einer L-Arabinopyranosyl-(1-3)-L-arabinopyranosyl-(1-6)-D-glucopyranose als wahrscheinlichste Formulierung. Für das Musennin selbst bleiben danach noch 2 Möglichkeiten offen, die durch die Anordnungen III und IV wiedergegeben werden. Von diesen scheint uns IV weniger wahrscheinlich, da sie nicht ohne weiteres erklären kann, warum wir bei der Hydrolyse immer nur ein Trisaccharid und niemals ein Tetrasaccharid isolieren konnten, während in III vermutlich die Bindung der Arabinose an das Hydroxyl an C-16 so fest ist, daß stets zuerst eine Spaltung der Zuckerkette zwischen Arabinose und Glucose erfolgt.



Unsere Ergebnisse stehen in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben von J. M. WATT und M. G. BREYER-BRANDWIJK²⁹⁾. Diese Autoren geben an, daß die Saponine aus der Rinde von *Albizzia anthelmintica* ungiftig für Regenwürmer seien, sich bei intravenöser Injektion für Kaninchen nicht toxisch erwiesen und auch nur eine geringe hämolytische Wirksamkeit zeigten. Wir möchten annehmen, daß die Unterschiede sich durch die verschiedene Art der

²⁶⁾ Herr Dr. GRIMMER hat zur weiteren Sicherung der OH-Gruppe an C-16 als Bindungsstelle der Zuckerkette die Halbwertszeiten der Chromsäureoxydation der Hydroxylgruppen in nachfolgenden Verbindungen bestimmt:

α -Amyrin 38, Oleanolsäure 38, Musennin 38, Musennin-methylester (hergestellt mit Diazomethan) 39, Echinocystsäure-methylester 44 und 80 Min. Daraus ergibt sich, daß ebenfalls nur das Hydroxyl an C-16 als Verknüpfungsort mit den Zuckern in Frage kommt.

²⁷⁾ R. KUHN, H. H. BAER und A. GAUHE, Chem. Ber. **88**, 1143 [1955].

²⁸⁾ S. MOORE und K. P. LINK, J. biol. Chemistry **133**, 293 [1940].

²⁹⁾ Arch. int. Pharmacodynam. Thérap. **33**, 267 [1927]; **36**, 233 [1930].

Isolierung erklären, da Musennin beim Erhitzen in wäßriger Lösung an Wirksamkeit verliert. L. FUCHS und K. JENTZSCH^{*)}, denen wir diese Feststellung verdanken, teilten uns auch mit, daß die Toxizität unserer Rinde allein auf den Musenningehalt zurückzuführen wäre und ca. 2% an Saponin zugegen sein müßten, was gut mit unseren präparativen Befunden übereinstimmt. Sie leiten diese Aussage einmal aus Untersuchungen mit *Eisenia foetida*³⁰⁾ und andererseits aus der Bestimmung des hämolytischen Index für Musennin ab, den sie mit Pferdeblut bei p_H 7.4 (Phosphatpuffer) zu 1:14000 bestimmten. Hämolytischer Index und Wirkung auf *Eisenia foetida* gehen jedoch nicht parallel, wie man feststellen kann, wenn man andere Saponine in den Kreis der Untersuchung einbezieht. Daß dem isolierten Musennin eine praktische Bedeutung zukommt, erscheint nicht sehr wahrscheinlich, weil die Toxizität am Warmblütler relativ bedeutend ist, wie orientierende Versuche von Prof. H. VOGEL, Hamburg, an Mäusen und Dr. A. ERHARDT, Brackwede, an Katzen auch bei peroraler Verabreichung ergaben^{**)}.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Extraktion der Rinde: 1.5 kg fein gemahlene und getrocknete Rinde wurden 48 Std. mit 3000 ccm Methanol bei Zimmertemperatur je 3 mal geschüttelt. Nach dem Abdampfen des Methanols i. Wasserstrahlvak. hinterblieben insgesamt 210 g eines dunkelbraunen Sirups. 630 g dieses Materials wurden durch Lösen in 2 l Wasser gemeinsam weiterverarbeitet. Es entstand eine trübe Lösung, die nacheinander mehrmals mit 1000 ccm Petroläther, Äther, Chloroform und Chloroform/Äthanol (1:1) extrahiert wurde. Eine Klärung der wäßrigen Phase trat erst nach der 4. Ausschüttelung mit Chloroform/Äthanol ein. Nach 8 maligem Extrahieren der wäßrigen Phase mit dem genannten Lösungsmittelgemisch war die Extraktion vollkommen, es wurden nach dem Abdampfen des Lösungsmittels insgesamt 117 g Trockenrückstand erhalten.

Die Rinde war nach 3 maliger Extraktion noch nicht völlig von Musennin befreit und enthielt noch ca. $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Menge. Dieser Anteil konnte durch weitere Extraktion mit Methanol ebenfalls gewonnen werden, auch 1-proz. wäßrige Pyridinlösung war hierfür gut brauchbar; letztere Lösung war aber wegen des starken Schäumens beim Eindampfen schwierig zu handhaben.

Aus der verbleibenden wäßrigen Lösung konnte nach dem Einengen und Stehenlassen Rohrzucker kristallisiert werden, Schmp. und Misch-Schmp. 185°. Die Hydrolyse mit Säure lieferte D-Glucose und D-Fructose, die papierchromatographisch im Lösungsmittelgemisch Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) durch ihren R_f -Wert 0.18 und 0.23 identifiziert wurden.

Chromatographie an saurem Aluminiumoxyd (Woelm): Auf eine Säule von 25 g Aluminiumoxyd (sauer, Teilchengröße 0.085–0.1 mm, eingeschlämmt mit Benzol) wurden 800 mg Rückstand des Chloroform/Äthanol-Extraktes, adsorbiert an wenig Aluminiumoxyd, aufgebracht. Die Fraktionsgröße war bei den Chargen 1–5 250 ccm, von da an 50 ccm.

Die Fraktionen 2–5 lieferten Kristalle vom Schmp. 285–289° (Phytosterolin).

Papierchromatographie: Für die Untersuchung der erhaltenen Fraktionen erwies sich die Chromatographie an Papier im Lösungsmittelgemisch Äthanol/Benzol/25-proz. Ammoniak

^{*)} Herrn Prof. L. FUCHS, Wien, sowie Herrn Dozent Dr. K. JENTZSCH, Wien, sind wir zu großem Dank für ihre Untersuchungen verpflichtet. Beide Herren werden ihre Ergebnisse mit Musennin und anderen Saponinen selbst publizieren.

³⁰⁾ K. JENTZSCH und H. RONGE, Arzneimittelforsch. 6, 639 [1956].

^{**)} Wir möchten auch hier beiden Herren unseren besonderen Dank für ihre Untersuchungen ausdrücken.

als gut brauchbar, auch Octanol/Methanol/Wasser/Dimethylformamid (5:5:5:1) war verwendbar. Im erstgenannten Lösungsmittelgemisch zeigte Musennin einen R_F -Wert von 0,78, im zweiten von 0,68. Die Anfärbung erfolgte mit 0,01-proz. Antimontrichlorid in Chloroform oder Zinntetrachlorid in Tetrachlorkohlenstoff/Eisessig (1:1) (10 ccm in 160 ccm Gemisch). In beiden Fällen bildete sich bei dreiminütigem Erhitzen im Trockenschrank auf 100° ein rotvioletter Fleck an der Stelle, an der sich das Musennin auf dem Papier befand.

Nr.	Lösungsmittel	mg	Farbe im UV	Wirksamkeit
1	Benzol	90	blau	0
2	Chloroform	20	orange	0
3	Chloroform + 1% Me.	39	gelborange	—
4	Chloroform + 5% Me.	22	schwach blau	—
5	Chloroform + 20% Me.	25	blau	0
6	Chloroform/Me. 1:1	45	blau	50 mg %
7	Chloroform/Me. 1:1	72	blau	50 mg %
8	Chloroform/Me. 1:1	49	blau	—
9	Chloroform/Me. 1:1	31	blau	10 mg %
10	Chloroform/Me. 1:1	20	blau	10 mg %
11	Methanol	50	blau	25 mg %
12	Methanol	36	blau	25 mg %
13	Methanol	36	blau	25 mg %
14	Methanol	20	blau	50 mg %
15	Methanol	10	blau	—

Chromatographie an anderen Adsorbentien: Die wirksamen Fraktionen aus der Chromatographie an saurem Aluminiumoxyd wurden einer weiteren Fraktionierung an Cellulosepulver (Lösungsmittel: wassergesättigtes Butanol), Hyflo Super Cel (Lösungsmittel wie bei Al_2O_3 sauer), Ionenaustauscher Amberlite IRA 410 und Aluminiumoxyd neutral bzw. alkalisch unterworfen, ohne daß eine Steigerung der Wirksamkeit erzielt werden konnte. Al_2O_3 neutral oder basisch erwies sich als ziemlich ungeeignet, weil das Musennin auf Grund seiner sauren Natur daran sehr festgehalten wurde. Andererseits hielt der genannte Ionenaustauscher Musennin nicht fest, da der saure Charakter für dieses Material zu gering war.

Ätherfällung: 5 g Chloroform/Äthanol-Extrakt-Rückstand wurden bei Zimmertemperatur in 100 ccm Wasser aufgenommen. Dabei löste sich ca. $1/10$ des Materials nicht (N_1), dieser Teil wurde durch Abzentrifugieren entfernt. Dann wurde die Lösung mit ca. 30 ccm Äther versetzt und kräftig umgeschüttelt. Nach kurzer Zeit begannen sich Flocken auszuscheiden, dieser Niederschlag wurde nach 30 Min. ebenfalls abzentrifugiert (N_2). Die zurückbleibende gelbbraune wäßrige Lösung lieferte bei mehrtägigem Stehenlassen eine weitere geringe Fällung, die in ihren Eigenschaften dem Präparat N_2 entsprach (N_3). Die verbleibende wäßrige Restlösung war dann unwirksam.

N_1 560 mg (11,5 %), Schmp. 170–185°, Wirksamkeit 50 mg %

N_2 1587 mg (31,6 %), Schmp. 204–209°, Wirksamkeit 10 mg %

N_3 600 mg (12 %), Schmp. 204–209°, Wirksamkeit 10 mg %

Eine bessere Reinigung als durch fraktionierte Fällung konnte erreicht werden, indem die drei Niederschläge (N_1 – N_3) gemeinsam in dem Gemisch Chloroform/Methanol/Wasser (10:10:7) verteilt wurden. Die Chloroformphase war nach der dritten Verteilung farblos und nahm im wesentlichen nur störende Verunreinigungen (Farbstoffe und Phytosterolin) auf. Die durch Fällung und Verteilung gereinigte Substanz zeigte nunmehr einen Schmp. von 215–220°.

Eigenschaften des Musennins: Musennin löste sich leicht in Wasser, die Lösung zeigte ein p_{H} von 5. Die Lösungen in Methanol waren sowohl im Sonnenlicht wie bei der Bestrahlung mit UV-Licht beständig. Eine Lösung in 1 *n* wäßr. Ammoniak zeigte nach 48 Stdn. bei Zimmertemperatur im Enchyträentest keinen Wirksamkeitsverlust. Dagegen war die Aktivität einer Lösung in 1 *n* Essigsäure nach 48 Stdn. bei Zimmertemperatur auf $1/20$ gesunken. Eine Probe, gelöst in $n/10$ HCl, war schon nach 15 Min. inaktiv. Eine wäßrige Lösung des Musennins in Wasser wies nach 30 Min. Erhitzen zum Sieden eine Wirksamkeitsabnahme auf $1/8$ auf. Alle Kristallisationsversuche verliefen ohne Erfolg.

Säurespaltung: 1 g Glykosid wurde in 20 ccm Methanol gelöst, die Lösung mit 20 ccm $n/2$ methanol. Salzsäure versetzt und 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Vorversuche unter papierchromatographischer Kontrolle hatten ergeben, daß diese Zeit für die Hydrolyse ausreichte. Die Lösung wurde erkalten gelassen und mit 250 ccm Wasser versetzt. Die erhaltene Fällung des Aglykons wurde abzentrifugiert und mehrmals mit Wasser ausgewaschen. Sie war schwach braun gefärbt, Ausb. 470 mg (100 % d. Th.).

Echinocystsäure-methylester-diacetat: 500 mg Aglykon wurden mit Diazomethan (2.5 Moll.) in 10 ccm Tetrahydrofuran unter Zusatz von 2 ccm Methanol umgesetzt. Nach 2 Stdn. wurde das Lösungsmittel bei 12 Torr entfernt und der verbleibende Rückstand mit 10 ccm Acetanhydrid und 10 ccm Pyridin versetzt. Die Mischung blieb 18 Stdn. bei 45° stehen. Dann wurde das Umsetzungsprodukt an einer Säule von 5 g neutralem Aluminiumoxyd chromatographiert. Die Elution erfolgte mit Petroläther, Benzol, Benzol/Chloroform (3:1) und schließlich mit reinem Chloroform. Die Fraktionen mit Benzol/Chloroform kristallisierten und lieferten 270 mg *Methylester-diacetat der Echinocystsäure*, Schmp. 200–201°, $[\alpha]_D^{25}$: $-15.0 \pm 1^\circ$ (Chloroform).

$C_{35}H_{54}O_6$ (570.8) Ber. C 73.64 H 9.54 CH_3CO 15.4

Gef. C 73.70 H 9.40 CH_3CO 15.4, 15.5

Echinocystsäure-methylester: Die Verseifung des Esteracetats mit 2-proz. methanol. Kalilauge 1 Stde. auf dem Wasserbad lieferte den Methylester vom Schmp. 216–217°, $[\alpha]_D^{25}$: $+33 \pm 1^\circ$ (Methanol).

Diketo-echinocystsäure-methylester: 160 mg *Echinocystsäure-methylester* wurden mit 0.2 g Chromtrioxyd in 12 ccm Eisessig 20 Stdn. bei Zimmertemperatur stengelassen. Nachdem der Überschuß an Chromsäure mit Methanol entfernt worden war, wurde die Lösung i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde mit 2 *n* H_2SO_4 und 2 *n* Na_2CO_3 gewaschen und schließlich zur Trockne eingedampft. Die Neutralfraktion wog 140 mg. Aus Äthanol umkristallisiert, Schmp. 153–155°, nach 3 maligem Umkristallisieren aus dem gleichen Lösungsmittel Schmp. 165–167°.

$C_{31}H_{46}O_4$ (482.7) Ber. C 77.13 H 9.61 Gef. C 76.90 H 9.47

Pyrogene Zersetzung des Musennins: 1329 mg *Musennin* wurden in Portionen von ca. 200 mg bei 10^{-1} – 10^{-2} Torr in einem Metallbad auf 270° erhitzt, allmählich wurde die Temperatur auf 300° gesteigert. Benutzt wurde eine Sublimationsapparatur mit einer Kühlfalle, an welcher sich allmählich ein weißes Sublimat absetzte. Insgesamt wurden 610 mg Sublimat erhalten. Sie wurden an einer Säule von neutralem Aluminiumoxyd (WOELM) chromatographiert. Eingeschlämmt wurde die Säule mit Petroläther. Eluiert wurde mit Petroläther, Petroläther/Benzol (1:1), Benzol, Benzol/Chloroform, Chloroform, Chloroform + 1 % Methanol, bzw. 20 % Methanol, Methanol sowie Methanol + 2 % Eisessig. Die Fraktionen mit Petroläther (1:1) lieferten Kristalle vom Schmp. 155–157°.

Norechinocystadienol: Die Kristalle vom Schmp. 155–157° wurden in Methanol gelöst, so daß eine heiß gesättigte Lösung entstand. Sie wurde eingeeengt und die ersten sich abschei-

denden Kristalle wurden abgesaugt. Sie zeigten nunmehr einen Schmp. von 183–186°, λ_{\max} 242 m μ , $\log \epsilon = 4.056$.

$C_{29}H_{46}O$ (410.7) Ber. C 84.81 H 11.28 Gef. C 84.54 H 11.12

Das *Acetat*, in üblicher Weise hergestellt, schmolz nach dem Umkristallisieren aus Äthanol bei 178–180°, $[\alpha]_D^{25}$: $+42 \pm 4^\circ$ (Dioxan).

$C_{31}H_{48}O_2$ (452.7) Ber. C 82.24 H 10.68 Gef. C 81.78 H 10.63

Echinocystsäure: Die Fraktionen, erhalten mit Methanol und Methanol/Eisessig von der Säule, lieferten ebenfalls Kristalle (aus Methanol kleine Nadelbüschel). Sie begannen sich bei 270° zu zersetzen und schmolzen dann unscharf bei 290–300°. Im geschlossenen Röhrchen und im auf 280° vorgeheizten Bad schmolz die Substanz bei 305–310°, $[\alpha]_D^{25}$: $+35 \pm 5^\circ$ (Chloroform).

$C_{30}H_{48}O_4$ (472.7) Ber. C 76.22 H 10.22 Gef. C 76.18 H 10.51

Wurde die reine Echinocystsäure unter den gleichen Bedingungen wieder der Sublimation unterworfen, so entstanden erneut ca. 12% C_{29} -Derivat, das aus dem Sublimat leicht durch Petroläther entfernt werden konnte.

Untersuchung der abgespaltenen Zucker: Das aus 5 g Musenin erhaltene Zuckergemisch wurde zunächst in wäßrig-methanolischer Lösung mit Ionenaustauscher Amberlite IRA 410 von der Säure befreit. Die papierchromatographische Untersuchung im System Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) zeigte nach Anfärben mit Anilinphthalat 3 Flecke mit den R_F -Werten 0.22 (sehr starke Färbung), 0.18 (stark) und 0.08 (schwach). Ein papierchromatographischer Vergleich mit Arabinose und Glucose machte es sehr wahrscheinlich, daß die beiden ersten R_F -Werte der L-Arabinose und der D-Glucose zuzuordnen waren.

Verteilungschromatographie an Cellulosepulver: 200 g Cellulosepulver wurden mit der schweren Phase des Lösungsmittelgemisches Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) ausreichend gesättigt und in eine Säule mit der gleichen Phase eingeschlämmt. Nachdem das Lösungsmittel abgetropft war, wurde die noch anhängende schwere Phase durch die leichte Phase des genannten Gemisches verdrängt. Dann wurde das Zuckergemisch, in möglichst wenig der leichten Phase gelöst, auf die Kolonne aufgebracht und mit der gleichen Phase entwickelt. Aufgefangen wurden je 100 ccm.

Die Fraktionen 1–4 lieferten Kristalle vom Schmp. 175°, die als α -Methylarabinosid identifiziert wurden, $[\alpha]_D^{25}$: $+240 \pm 2^\circ$ (Wasser). Nach Hydrolyse mit Säure wurde im Papierchromatogramm der R_F -Wert der Arabinose beobachtet. Ausb. 600 mg.

Die Fraktionen 5–7 lieferten einen farblosen Schaum, der ebenfalls den R_F -Wert der Arabinose zeigte, es handelte sich um freie *Arabinose* in einer Menge von 324 mg.

Die Fraktionen 8–10 ergaben ein Kristallisat vom Schmp. 245–247°, Ausb. 128 mg.

Die Fraktionen 11–14 ergaben wieder einen farblosen Sirup, der den R_F -Wert der D-Glucose zeigte, in einer Menge von 230 mg. Zur Identifizierung wurde das *p*-Nitranilin-*N*-glucosid vom Schmp. 184° hergestellt, das mit derselben Verbindung aus D-Glucose keine Schmelzpunktsdepression ergab.

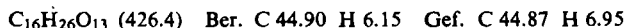
Die Fraktionen 15–20 lieferten ein weiteres Kristallisat vom Schmp. 162–164°, Ausb. 366 mg.

Kristallisat vom Schmp. 245–247°: Es zeigte keine Reaktion mit Anilinphthalat und ein $[\alpha]_D^{25}$: $+125 \pm 4^\circ$ (Wasser). Die Analyse war nur mit dem Methylglykosid eines Trisaccharids vereinbar.

$C_{17}H_{30}O_{14}$ (458.4) Ber. C 44.60 H 6.60 Gef. C 44.30 H 7.01

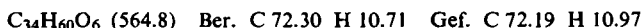
Die Hydrolyse mit $2n$ HCl 1 Stde. auf dem Wasserbad lieferte ein Gemisch von Zuckern, die papierchromatographisch als D-Glucose und L-Arabinose erkannt wurden. Die Anfärbung des Arabinosefleckes mit Anilinphtalat war besonders intensiv.

Kristallisiert vom Schmp. 162–164°: Dieses Kristallinat hatte einen R_F -Wert von 0.08; $[\alpha]_D^{25}$: $+35 \pm 5^\circ$ (Wasser), nach 10 Min.; $+80 \pm 5^\circ$, nach 48 Stdn.



Die Analyse würde mit einem Anhydroderivat eines Trisaccharids aus 2 Arabinose und 1 Glucose vereinbar sein, der zu hohe H-Wert konnte aus Mangel an Substanz vorerst nicht wiederholt werden. Die saure Hydrolyse ergab ebenfalls Arabinose und Glucose, wobei die Anfärbung mit Anilinphtalat bei der Arabinose auch hier besonders stark ausfiel.

Phytosterolin vom Schmp. 286–289°: Diese Verbindung wurde einmal aus den ersten Fraktionen der Chromatographie des Chloroform/Äthanol-Extraktes an neutralem Aluminiumoxyd als auch durch Chromatographie der schweren Phase der Verteilung zur Reinigung des Musennins vor der Ätherfällung erhalten. Sie kristallisierte aus Äthanol in Nadeln, mit Zinntetrachlorid zeigte sie eine braune Färbung, die unter UV-Licht braunrot erschien.



Nach der Hydrolyse mit $n/2$ methanol. Salzsäure oder mit Luizym konnte Glucose papierchromatographisch nachgewiesen werden. Aus dem Spaltansatz mit dem genannten Fermentmaterial wurde das Aglykon mit einem Schmp. von 155–156° aus Äthanol kristallisiert erhalten, $[\alpha]_D^{25}$: $-11 \pm 4^\circ$ (Chloroform). Das gleiche Sterin, vermutlich ein Gemisch, konnte auch direkt aus den ersten Fraktionen der Aluminiumoxyd-Chromatographie erhalten werden.

Permethylierung des Musennins¹⁹⁾: 3.5 g Musennin wurden in 75 ccm Dimethylformamid gelöst, die Lösung mit 25 g Silberoxyd und 25 ccm Methyljodid versetzt und die Mischung 40 Stdn. geschüttelt. Danach wurde der hellgraue, ungelöste Anteil abfiltriert, mit Dimethylformamid ausgewaschen und das Filtrat erneut mit 25 g Silberoxyd und 25 ccm Methyljodid 40 Stdn. geschüttelt. Der jetzt dunkelgrau bis braun gefärbte Silberniederschlag wurde durch Filtration entfernt, die Dimethylformamidlösung mit Wasser verdünnt und die Lösung sechsmal mit Benzol extrahiert. Die Ausb. an permethyliertem Produkt betrug 3.3 g.

Die papierchromatographische Untersuchung im System Octanol/Pentanol/Wasser/Formamid (6:2:1:4) ergab nur einen Fleck mit dem R_F -Wert 0.14 (Anfärbung mit $SbCl_3$).

Hydrolyse: 1.3 g des methylierten Glykosids wurden in 20 ccm Methanol gelöst, die Lösung mit 20 ccm $2n$ HCl versetzt und die Mischung 5 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Methanol abdestilliert und eine $1/2$ stdg. Nachhydrolyse vorgenommen. Das dabei ausgeschiedene methylierte Aglykon wurde durch Abzentrifugieren abgetrennt und unter Zusatz von etwas Entfärbungskohle aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Es erwies sich als *Echinocystsäure-methylester* vom Schmp. 216–217°. Ausb. 400 mg (76 % d. Th.).

Die wäßrige Lösung wurde mit dem Ionenaustauscher IRA 410 entsäuert und die Lösung i. Vak. zur Trockne eingedampft. Die papierchromatographische Untersuchung des Gemisches der methylierten Zucker ergab 3 mit Anilinphtalat anfärbbare Komponenten mit den R_F -Werten 0.61, 0.78 und 0.92.

Chromatographie der methylierten Zucker²⁰⁾: Diese wurden an Carboraffin/Hyflo Super Cel (1:1) in 5-proz. Methyläthylketon in Wasser chromatographiert und 50-ccm-Fractionen aufgefangen.

Frakt. 1 - 6	229 mg, R_F -Wert 0.61 (sehr stark), daneben (sehr schwach) 0.78
Frakt. 7 - 13	94 mg, R_F -Wert 0.78
Frakt. 14 - 17	— —
Frakt. 18 - 30	100 mg, R_F -Wert 0.92

Identifizierung der methylierten Zucker: Zuckerderivat 1 (R_F -Wert 0.61): Es wurde papierchromatographisch im Gemisch Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:3) mit authent. 2,4-Dimethyl-arabinose im R_F -Wert und in der Art der Anfärbung mit Anilinphthalat verglichen und als identisch befunden. Die ebenfalls geprüften 2,3- und 2,5-Dimethyl-arabinose zeigten andere R_F -Werte.

Zuckerderivat 2 (R_F -Wert 0.78): Die Fraktionen 7–12 wurden vereinigt und i. Vak. destilliert. Das erhaltene Öl zeigte eine Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: $+68 \pm 2^\circ$, in Methanol. Danach konnte es sich um die 2,3,4-Trimethyl-glucose handeln, die durch Hydrolyse von permethylierter Raffinose hergestellt wurde. Der R_F -Wert beider Verbindungen erwies sich als gleich.

Zuckerderivat 3 (R_F -Wert 0.92): Es wurde durch Sublimation gereinigt und zeigte folgende Konstanten: Schmp. $78 - 82^\circ$, $[\alpha]_D^{20}$: $+125 \pm 4^\circ$ (Wasser). Für 2,3,4-Trimethyl-arabinose findet sich in der Literatur³¹⁾ Schmp. $81 - 82^\circ$, $[\alpha]_D^{20}$: $+133.4^\circ$ (Wasser).

Methylierung der Musenose: Das Trisaccharid wurde in der gleichen Weise, wie beim Glykosid beschrieben, methyliert und hydrolysiert. Als methylierte Zucker wurden erhalten: 2,4-Dimethyl-arabinose, 2,3,4-Trimethyl-arabinose und 2,3,4-Trimethyl-glucose zu etwa gleichen Teilen.

Oxydation der Musenose mit Hypojodit³²⁾: 20 mg Musenose in 1 ccm wäßrig/methanol. Lösung wurden mit 0.3 ccm einer Lösung von 0.57 g Jod und 0.50 g $BaJ_2 \cdot 2H_2O$ in 10 ccm Methanol versetzt. Unter kräftigem Schütteln wurden 1.2 ccm 4-proz. Kalilauge im Verlauf von 10 Min. zugefügt. Nach Neutralisation mit $n H_2SO_4$ und Eindampfen zur Trockne wurde der Rückstand mehrmals mit Methanol ausgezogen, wobei die Hauptmenge an Salzen zurückblieb. Die Lösung wurde mit 4 ccm $n H_2SO_4$ 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt und nach Abdampfen des Methanols $1/2$ Stde. nachhydrolysiert. Danach ließ sich papierchromatographisch keine Glucose mehr nachweisen.

³¹⁾ I. C. IRVINE, J. chem. Soc. [London] **119**, 1744 [1921]; W. CHARLTON, W. N. HAWORTH und R. W. HERBERT, ebenda **1931**, 2855.

³²⁾ T. PURDIE und R. E. ROSE, J. chem. Soc. [London] **89**, 1204 [1906].