

und es liessen sich hinsichtlich ihres Vorkommens in den Spingomyelinen aus einzelnen Hirnabschnitten keine klaren Unterschiede feststellen.

Das Gemisch der *Lecithinfettsäuren* war erfahrungsgemäss viel weniger reichhaltig zusammengesetzt, es dominierten vor allem Palmitin- und Ölsäure, wobei das Mark von letzterer 52, von der Palmitinsäure 33% aufwies und sich jedenfalls von der Rinde diesbezüglich unterschied.

Unsere Untersuchungen haben demnach deutlich ergeben, dass die Fettsäurezusammensetzung reiner Lipidfraktionen aus menschlichem Hirn bezüglich ihrer Herkunft quantitative Unterschiede aufweist, die jedenfalls für das Grosshirn-Mark bei dem untersuchten Material deutlich in Erscheinung traten.

Die mitgeteilten Untersuchungen wurden mit Mitteln des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS durchgeführt, wofür wir bestens danken.

Physiologisch-Chemisches Institut  
der Universität Basel

## 203. Über die Inhaltstoffe von *Zizyphus oenoplia* MILL.

### 1. Mitteilung: Isolierung der Inhaltstoffe

von E. L. Ménard, J. M. Müller, A. F. Thomas<sup>1)</sup>;  
S. S. Bhatnagar und N. J. Dastoor<sup>2)</sup>

(5. VI. 63)

Pflanzenmaterial der Gattung *Zizyphus* JUSS. (Familie der *Rhamnaceae*) wurde schon in den alten griechischen, arabischen, persischen, indischen und chinesischen Arzneimittelsystemen therapeutisch verwendet. Bis in unsere Zeit bedient sich auch die Volksheilkunde vieler Länder der Tropen- und Subtropen-Zonen der aus diesen Pflanzen hergestellten Zubereitungen<sup>3)</sup>.

So sollen die «Jujube» oder «Unnab» genannten steinfruchtartigen, schleimhaltigen Früchte u. a. als Expektorantien, Blutreinigungsmittel, milde Laxantien und bei Gallenleiden wirken. Ausserdem wird in chinesischen<sup>4)</sup> und japanischen<sup>5)</sup> Arbeiten wiederholt auf ihre nervenberuhigende Wirkung hingewiesen. Die Blätter einzelner Arten (z. B. *Z. vulgaris* LAM.<sup>6)</sup>) üben, wenn zerkaut, eine bis 10 Minuten anhaltende anästhesierende Wirkung auf der Zunge aus. Sie sollen ausserdem, wie auch die bitter schmeckenden, tanninhaltigen Stamm- und Wurzelrinden, u. a. zur Wundheilung und gegen Diarrhöe Verwendung finden<sup>3)</sup>.

Die weite Verbreitung dieser therapeutisch wertvollen Pflanzengattung gab wiederholt Anlass zur chemischen Untersuchung.

<sup>1)</sup> Gegenwärtige Adresse: FIRMENICH & Co., Genève.

<sup>2)</sup> Vgl. N. J. DASTOOR, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Master of Science, Caius Research Laboratory, St. Xavier's College, Bombay, 1960; gegenwärtige Adresse: Universität Zürich, Organisch-chemisches Institut (Prof. H. SCHMID).

<sup>3)</sup> Vgl. dazu: R. N. CHOPRA, S. L. NAYAR & I. C. CHOPRA, Glossary of Indian Medicinal Plants, New Delhi 1956, p. 261; K. R. KIRTIKAR & B. D. BASU, Indian Medicinal Plants, Allahabad 1935, 2. Auflage, Bd. I, p. 588.

<sup>4)</sup> T.-H. TANG & Y.-H. CHAO, J. chinese chem. Soc. 4, 278 (1936); Chem. Abstr. 31, 209<sup>8</sup> (1937).

<sup>5)</sup> R. KAWAGUTI & K. W. KIM, J. pharmaceut. Soc. Japan 60, 171, 343, 595 (1940); Chem. Abstr. 35, 1396<sup>8</sup>, 3997<sup>1</sup> (1941).

So führte eine 1936 erschienene Arbeit über die chinesische Droge «Hsuan Tsao Ren»<sup>4)</sup>, die aus Samen von *Z. vulgaris* LAM. besteht, zur Isolierung dreier Fettsäuren und zweier nicht identifizierter Phytosterine; Alkaloide liessen sich nicht nachweisen. In drei Arbeiten über die Samenbestandteile der gleichen Art gelang KAWAGUTI & KIM<sup>5)</sup> die Identifizierung von Betulinsäure, Betulin, Sitosterin, sowie von Ölsäure, Linolsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure und Behensäure. Mit dem Gehalt an Fettsäuren in Samen von *Z. jujuba* LAM.<sup>7)</sup> und *Z. xylopyrus* WILLD.<sup>8)</sup> befassen sich auch zwei neuere indische Arbeiten. Weiterhin sei auf zwei Publikationen hingewiesen, die im Rahmen von Reihenuntersuchungen die ostafrikanische *Z. spina-christi* WILLD. als Tanninpflanze (Gehalt der Rinde 9,25%<sup>9)</sup>) und die argentinische *Z. mistol* GRISEBACH<sup>10)</sup> als Medizinalpflanze erwähnen, sowie auf eine chemische Analyse der in Brasilien zur Herstellung von Detergentien verwendeten *Z. joazeiro* MART.<sup>11)</sup> mit einem Saponingehalt von 11–12% in der Rinde. Aus derselben Rinde wurde überdies eine nicht näher identifizierte organische Säure, die sogenannte Juazosäure mit der vorgeschlagenen Summenformel  $C_{26}H_{42}O_4$ , isoliert<sup>12)</sup>. Schliesslich ist auch der Gehalt an Vitamin C in Beeren von *Z. jujuba* und *Z. vulgaris* (vgl. <sup>6)</sup>), und an Niacin (15  $\mu$ g/g), Niacinamid (5  $\mu$ g/g) und Pantothensäure (6  $\mu$ g/g) in Drogenzubereitungen von *Z. vulgaris* bestimmt worden<sup>13)</sup>.

Die Tatsache allein, dass einerseits die volksmedizinischen Indikationen auf eine eher geringe Spezifität der Wirkstoffe schliessen lassen und dass andererseits in keiner der oben erwähnten Publikationen ein Hinweis auf eine für die angegebenen Wirkungen möglicherweise verantwortliche chemische Verbindung zu finden ist, liess eine chemisch-pharmakologische Untersuchung als nicht sehr aussichtsreich erscheinen. Erst eine direkte mündliche Information<sup>14)</sup> über die medikamentöse Anwendung der wässerigen Auszüge aus Stamm- und Wurzelrinde von *Zizyphus oenoplia* MILL. beim Auftreten von Pockenerkrankungen in gewissen Gegenden Südindiens hat uns dazu bewogen, diese bisher chemisch noch unbearbeitete Pflanze näher zu prüfen.

*Zizyphus oenoplia* MILL. ist ein in Südindien, Ceylon und im südöstlichen tropischen Asien sowie in Australien beheimateter dorniger Strauch<sup>3)</sup>. Wir haben seine Wurzelrinde chemisch analysiert und dabei gefunden, dass die zu etwa 0,3%

- <sup>6)</sup> Zitiert als *Z. sativa* GAERTN.; E. N. TARAN, Farmatsiya 4 (No. 11, 12), 20 (1941); Chem. Abstr. 38, 2792<sup>8</sup> (1944).
- <sup>7)</sup> T. N. MEHTA, C. V. N. RAO & V. LAXMIKANTAM, Indian Soap J. 19, 94 (1953); Chem. Abstr. 49, 16470<sup>8</sup> (1955). Vgl. auch: A. Z. STAHL, Fla. Agr. expt. Sta., Bull. 283, 20 pp.
- <sup>8)</sup> J. W. AIRAN, Current Sci. (India) 17, 150 (1948); Chem. Abstr. 42, 7552<sup>8</sup> (1948). Vgl. auch: J. W. AIRAN & S. B. RAJOPADHYE, J. indian chem. Soc., Ind. & News Ed. 12, 152 (1949); Chem. Abstr. 44, 11138<sup>c</sup> (1950).
- <sup>9)</sup> E. SIMONCINI, Boll. Staz. sper. Ind. Pelli Mat. concianti 16, 173 (1938); Chem. Abstr. 32, 8824<sup>8</sup> (1938).
- <sup>10)</sup> J. M. RODRIGUEZ & C. A. O'DONELL, Rev. farm. (Buenos Aires) 84, 201 (1942); Chem. Abstr. 37, 501<sup>9</sup> (1943); botanische Arbeit. Vgl. auch: C. T. RIETTI, Rcv. Soc. argentina Biol. 14, 207 (1938); Biol. Abstr. 12, 14545 (1938).
- <sup>11)</sup> J. S. ROSA & A. IACHAN, Anais Assoc. quím. Brasil 10, 236 (1951); Chem. Abstr. 47, 5703<sup>b</sup> (1953).
- <sup>12)</sup> L. D. ANTONACCIO, Rev. Quím. ind. (Rio de Janeiro) 26, 129 (1957); Chem. Abstr. 52, 15424<sup>8</sup> (1958).
- <sup>13)</sup> M. DAMODARAN & M. SRINIVASAN, Current Sci. 3, 553 (1935); Chem. Abstr. 29, 6317<sup>5</sup> (1935); E. CASERIO, Z. Vitaminforsch. 4, 173 (1935); Chem. Abstr. 29, 6965<sup>8</sup> (1935). Vgl. auch: R. B. FRENCH & O. D. ABBOT, Florida Agr. expt. Sta. Techn. Bull. 444, 21 pp.; Chem. Abstr. 43, 3535<sup>1</sup> (1949). – M. GOTO, J. pharmaceut. Soc. Japan 77, 467, 471 (1957).
- <sup>14)</sup> Der eine von uns (S. S. B.) wurde von einem katholischen Geistlichen auf diese Anwendung der Pflanze aufmerksam gemacht. Die Auszüge werden durch mehrtägiges Einhängen von Wurzel- oder Stammstücken in irdene Gefässe mit Wasser zubereitet.

darin enthaltene Betulinsäure wohl in der Hauptsache für die erwähnte Wirkung verantwortlich ist. Sie bewirkt nämlich an den isoliert durchströmten Gefässen des Kaninchens eine deutliche Gefässverengung. Ausserdem hemmt sie die an der Ratte durch Dextran erzeugte, entzündliche Pfortenschwellung. Schliesslich lässt sich die bei artifiziell mit Ektromelievirus infizierten Mäusen auftretende Pfortenschwellung durch Behandlung mit Betulinsäure verzögern. Eine Hemmung der Virusentwicklung wurde dabei jedoch nicht beobachtet<sup>15)</sup>.

Weiterhin sei noch erwähnt, dass ausser *Z. oenoplia* MILL. auch die nachfolgenden in Indien heimischen *Zizyphus*-Arten Betulinsäure enthalten: *Z. jujuba* LAM., *Z. xylopyrus* LAM., *Z. rugosa* LAM. und *Z. nummularia* W. et A.

Aus *Z. oenoplia* haben wir ausser Betulinsäure noch zwei neuartige, physiologisch praktisch unwirksame, chemisch hingegen sehr interessante basische Peptide isoliert, die wir *Zizyphin* und *Zizyphinin* nennen. Überdies waren in den wässrigen Restlaugen verschiedene Zucker und dialysierbare Polysaccharide nachzuweisen. Ausserdem gelang es, Palmitinsäure zu isolieren.

*Isolierung der reinen kristallisierten Inhaltstoffe:* Die Auftrennung der chemischen Inhaltstoffe erfolgt in zwei Stufen. In einer ersten Phase trennt man die Betulinsäure, die mit 0,3% Gehalt die Hauptkomponente darstellt, durch Kristallisation vom Gemisch der übrigen Stoffe ab. Dies kann durch direkte Kristallisation aus dem stark eingeeengten Methanol- oder Äthanolextrakt oder aber durch selektive Vorextraktion der Triterpensäure mittels Äther, Benzol, Essigester oder Tetrachlorkohlenstoff geschehen. Die Reinigung erfolgt über das in warmem Methanol relativ schwer lösliche Natriumsalz. Die dabei anfallenden Mutterlaugen, bzw. der von der Betulinsäure befreite Methanolextrakt enthalten als interessanteste Komponenten die beiden basischen Peptide und werden nach Schema 1 weiter fraktioniert.

*Charakterisierung der Reinsubstanzen.* – a) Die isolierte *Betulinsäure*, ihr Methyl-ester und das Methyl-ester-acetat erwiesen sich in jeder Beziehung als identisch mit authentischem Material (z. B. aus *Platanus occidentalis* L.<sup>16)</sup>). Durch Hydrierung des Methyl-esters mit  $\text{LiAlH}_4$  erhielt man Betulin, das mit dem aus *Betula alba* L. gewonnenen Triterpenalkohol identisch war.

b) *Zizyphin* und *Zizyphinin* besitzen die in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellten physikalischen und chemischen Eigenschaften. *Zizyphin* lässt sich zusätzlich durch das kristallisierte Perchlorat seines *Dihydroderivates* (Smp. 167–170°) charakterisieren.

Weiterhin zeigen die drei Basen die in Tabelle 3 zusammengestellten charakteristischen Farbreaktionen.

c) Die Bestimmung der *Bestandteile der hydrophilen Restkomponente* wird im experimentellen Teil im einzelnen beschrieben.

*Hinweise auf die Struktur des Zizyphins und Zizyphinins.* Die Analysenwerte der Salze zeigen, dass von den 5 Stickstoffatomen nur eines basischen Charakter besitzt. Bei der sauren Totalhydrolyse (in 6N HCl) des *Zizyphins* lassen sich neben Kohlensäure papierchromatographisch Prolin und Isoleucin nachweisen. Im Massenspektro-

<sup>15)</sup> Wir verdanken diese Befunde den Herren Dres. F. KRADOLFER, J. TRIPOD, H. TURRIAN & R. WYLER aus den Laboratorien der Biologischen Abteilung der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel.

<sup>16)</sup> A. F. THOMAS & J. M. MÜLLER, *Chemistry & Ind.* 1961, 1794.

Schema 7

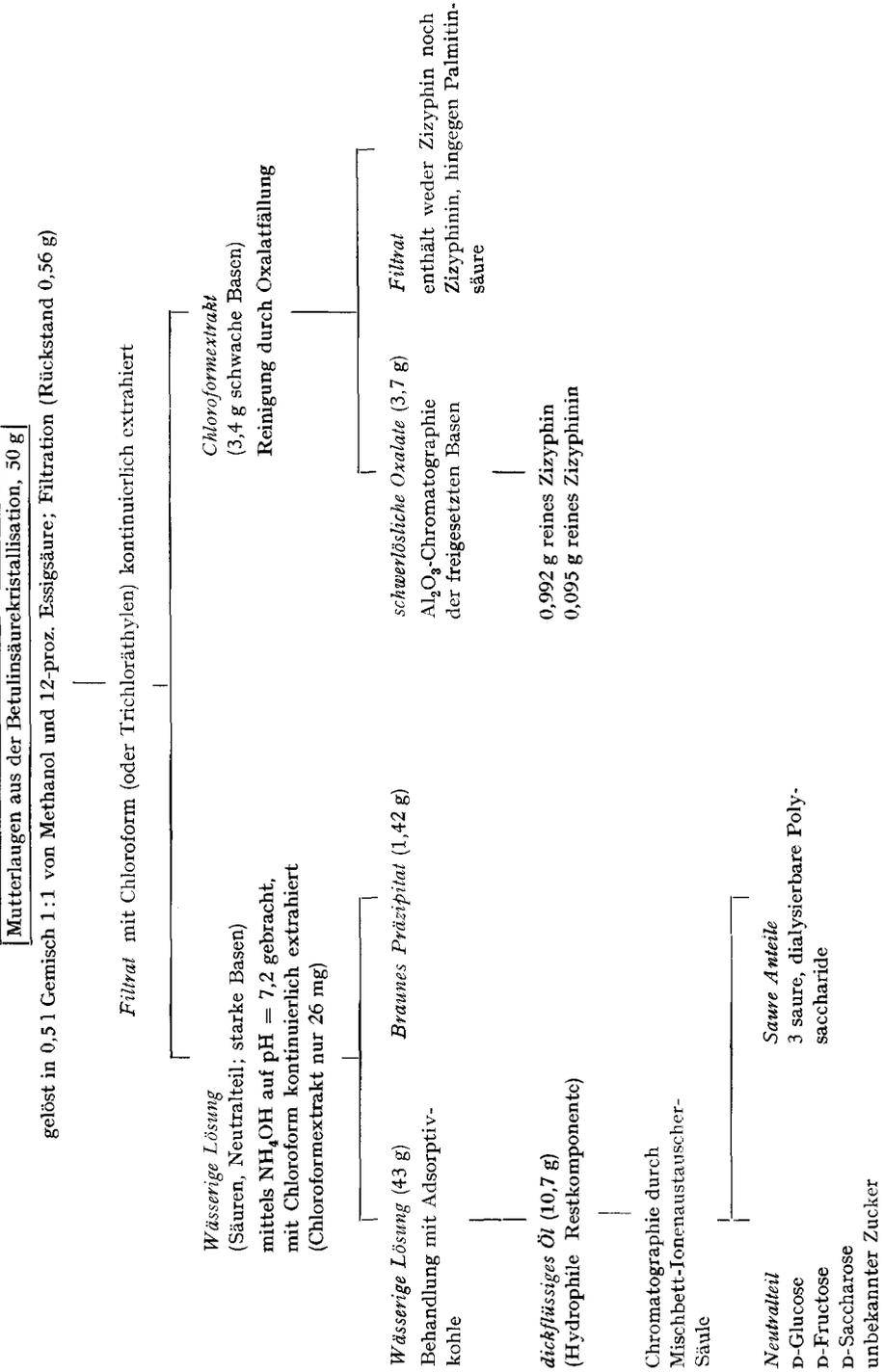


Tabelle 1. *Eigenschaften der basischen Peptide*

	Zizyphin	Zizyphinin
Schmelzpunkt <sup>17)</sup>	121° (Zers.)	(amorph)
$[\alpha]_D^{24}$	-464,7° ± 1° in CHCl <sub>3</sub> (c = 1)	-457° ± 1° in CHCl <sub>3</sub> (c = 1)
Mol. Gewichtsbestimmung		
Mol. Gew. nach RAST		598,7
Äq. Gew. (Dr. W. SIMON <sup>18)</sup> )	642	626
Äq. Gew. (Dr. H. MAJER <sup>19)</sup> )	628	
Mol. Gew. (Dr. W. SIMON <sup>19)</sup> )	624 ± 16	611 ± 16
Mol. Gew. (Dr. H. HÜRZELER <sup>20)</sup> )	611	597
pK <sub>s</sub> (Dr. W. SIMON <sup>21)</sup> )	5,8	6,55
pK <sub>s</sub> (Dr. H. MAJER <sup>21)</sup> )	6,23	
Elementaranalyse <sup>22)</sup>	gef. (ber. f. C <sub>33</sub> H <sub>49</sub> O <sub>8</sub> N <sub>5</sub> )	gef. (ber. f. C <sub>32</sub> H <sub>47</sub> O <sub>8</sub> N <sub>5</sub> )
C	64,50% (64,79%)	64,04% (64,30%)
H	8,18% (8,07%)	7,76% (7,93%)
O	15,86% (15,69%)	16,17% (16,16%)
N	11,27% (11,45%)	11,58% (11,72%)
	(MG. 611,76)	(MG. 597,74)
(C)-CH <sub>3</sub>	7,73% = 3 C-CH <sub>3</sub>	7,59% = 3 C-CH <sub>3</sub>
(O)-CH <sub>3</sub>	2,48% = 1 OCH <sub>3</sub>	2,55% = 1 O-CH <sub>3</sub>
(N)-CH <sub>3</sub>	5,51% = 2 N-CH <sub>3</sub>	4,98% = 2 N-CH <sub>3</sub>
(CO)-CH <sub>3</sub>	0,75% = 0,3 COCH <sub>3</sub>	0,3 % = 0,1 O-COCH <sub>3</sub>
-NH <sub>2</sub>	1,37; 1,09% = 0,5 NH <sub>2</sub>	1,10; 0,83% = 0,5 NH <sub>2</sub>
UV.-Spektren	in Feinsprit: λ <sub>max</sub> 206 mμ (ε = 38000) <sup>23)</sup> λ <sub>max</sub> 267 mμ (ε = 10800) λ <sub>max</sub> 319 mμ (ε = 8270) in Dioxan: λ <sub>max</sub> 243 mμ (ε = 11100) λ <sub>max</sub> 273 mμ (ε = 9600) λ <sub>max</sub> 321 mμ (ε = 8950) (für MG. 611,76)	in Feinsprit: λ <sub>max</sub> 267 mμ (ε = 10220) λ <sub>max</sub> 320 mμ (ε = 7760) (für MG. 597,74)
IR.-Spektren (in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) <sup>24)</sup> (Absorptionsbanden)	2,67; 2,87; 3,32; 3,42; 3,47; 3,53; 5,87; 6,05; 6,25; 6,61; 7,05; 7,55; 8,16; 8,43; 9,5; 12,3 μ	identisch mit Spektrum von Zizyphin; es fehlt die Bande 3,53 μ
Protonenresonanz- Spektren <sup>25)</sup>	52/s + 58/s + 120/b + 138/s + 157/s + 163/s (total 32); 204/b + 214/b + 229/s (total 5); 253/b + 262/s + 268/s + 276/s + 282/s (total 5); 313/q(1); 357/d/J = 9,5 Hz(1); 412/s + 415/q (total 4); 502/d(1).	52/s + 55/s + 58/s + 61/s + 121/b + 141/s + 144/s (total 27); 175/d/J = 4,5 Hz + 201/b + 213/b (total 3); 228/s(3); 265/b(5); 318/b(1); 357/d/J = 9 Hz (1); 406/s + 411/s + 417/s + 434/s (total 5); 457/d(1); 504/d(1)
Mikrohydrierung mit Pt/Eisessig	3,81 Mol. H <sub>2</sub> aufgenommen	5,1 Mol. H <sub>2</sub> aufgenommen
Hydrierung mit Pt/Feinsprit	1 Mol. H <sub>2</sub> aufgenommen	
«H» aktiv	0,36% (kalt und heiss)	0,35% (kalt und heiss)
Löslichkeit: gut löslich in	Äther, MeOH, EtOH, EtOAc, Aceton, Benzol, chlorierten KWen	gleich wie bei Zizyphin
unlöslich in	KWen, H <sub>2</sub> O	gleich wie bei Zizyphin

Tabelle 2. *Eigenschaften der Salze der basischen Peptide*

Schmelzpunkt <sup>17)</sup>	Zizyphin-hydrochlorid 184–184,5°	Zizyphinin-hydrochlorid 242–243° Zers.
Elementaranalyse <sup>22)</sup>	gef. (ber. f. C <sub>33</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub> N <sub>5</sub> Cl)	gef. (ber. f. C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub> N <sub>5</sub> Cl, H <sub>2</sub> O)
C	60,84% (61,14%)	59,13; 58,97% (58,89%)
H	7,87% (7,77%)	7,46; 7,29% (7,20%)
N	10,59% (10,80%)	
Cl	5,18% (5,45%) (MG. 648,25)	5,41; 5,39% (5,43%) (MG. 652,61)
UV.-Spektren (in Feinsprit)	$\lambda_{max}$ 267 m $\mu$ ( $\epsilon = 11400$ ) $\lambda_{max}$ 318 m $\mu$ ( $\epsilon = 7200$ )	
pK <sub>s</sub> (Dr. H. MAJER <sup>21)</sup> )	5,60	
Schmelzpunkt <sup>17)</sup>	Zizyphin-oxalat 139,5–140,5°	Zizyphinin-oxalat 140,6–141,6°
Elementaranalyse <sup>22)</sup>	gef. (ber. f. C <sub>35</sub> H <sub>51</sub> O <sub>10</sub> N <sub>5</sub> , H <sub>2</sub> O)	keine Analysen
C	58,22% (58,40%)	
H	7,32% (7,42%)	
N	9,69% (9,43%) (MG. 719,83)	
UV.-Spektren (in Feinsprit)	$\lambda_{max}$ 267 m $\mu$ ( $\epsilon = 13900$ ) $\lambda_{max}$ 313 m $\mu$ ( $\epsilon = 9400$ )	
pK <sub>s</sub> (Dr. H. MAJER <sup>21)</sup> )	5,77	
Schmelzpunkt <sup>17)</sup>	Zizyphin-perchlorat 268–269° (Zers.)	Zizyphin-hydrojodid 172,5–173,5°
Elementaranalyse <sup>22)</sup>	gef. (ber. f. C <sub>33</sub> H <sub>50</sub> O <sub>10</sub> N <sub>5</sub> Cl $\frac{1}{2}$ H <sub>2</sub> O)	gef. (ber. f. C <sub>33</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub> N <sub>5</sub> J)
C	54,81 (54,96%)	53,53% (53,58%)
H	7,46 (7,13%)	7,00% (6,81%)
O	22,86 (23,29%)	
N	9,77 (9,71%)	9,54% (9,47%)
Halogene	Cl: 5,05 (4,92%) (MG. 721,25)	J: 16,71% (17,16%) (MG. 739,70)
UV.-Spektren (in Feinsprit)	$\lambda_{max}$ 266 m $\mu$ ( $\epsilon = 13600$ ) $\lambda_{max}$ 314 m $\mu$ ( $\epsilon = 9000$ )	
pK <sub>s</sub> (Dr. H. MAJER <sup>21)</sup> )	5,77	

<sup>17)</sup> Eingeschmolzen unter Stickstoffatmosphäre in Glaskapillare.

<sup>18)</sup> Aus Titration mit Salzsäure.

<sup>19)</sup> Bestimmt mit der Tropfmethode (W. SIMON, *Chimia* 16, 312 (1962)).

<sup>20)</sup> Aus Massenspektrogramm (vgl. Exp. Teil).

<sup>21)</sup> Bestimmt in Methylcellosolve-Wasser-(8:2)-Gemisch.

<sup>22)</sup> Sowohl die Basen wie ihre Salze sind ausnahmslos stark hygroskopisch.

<sup>23)</sup> Gemessen in einer 1-mm-Quarzküvette.

<sup>24)</sup> Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-double-beam-Instrument, Mod. 221.

<sup>25)</sup> Die Protonenresonanz-Spektren wurden mit einem VARIAN DP-60-Spektrometer bei 60 MHz in Deuteriochloroform aufgenommen. Die Protonenresonanzsignale sind in Hz angegeben und auf Tetramethylsilan als internen Standard bezogen. Folgende Abkürzungen wurden benützt: *s* (Singlett), *d* (Doublett), *q* (Quadruplett), *b* (breiter, nicht aufgelöster Signalkomplex). Die in Klammern beigefügten Zahlen geben die durch elektronische Integration bestimmte auf- oder abgerundete Protonenzahl an.

gramm treten verschiedene Massenzahlen auf, welche diesen beiden Aminosäuren zugeordnet werden könnten<sup>20</sup>). Ausserdem erlaubt dieses Hilfsmittel die einwandfreie Bestimmung der Molekulargewichte und damit der exakten Summenformel (vgl. Tabellen 1 und 2).

Über die im Gange befindliche Strukturaufklärung wird in einer späteren Publikation berichtet werden.

Die Papier-, Dünnschicht- und Gas-Chromatogramme wurden von den Herren Dr. R. NEHER, E. VON ARX und Dr. H. ABEGG, die pK-Bestimmungen von Dr. H. MAJER und von P.-D. Dr. W. SIMON, die Infrarot- und Protonenresonanz-Spektren von Dr. R. ZÜRCHER, die Ultraviolett- und Massen-Spektren von Dr. H. HÜRZELER, und die Mikroanalysen von Dr. W. PADOWETZ durchgeführt bzw. aufgenommen und werden bestens verdankt. Für wertvolle technische Hilfe sind wir ausserdem Herrn F. STADLER zu grossem Dank verpflichtet. Eine Trichloräthylenextraktion in grösserem Maßstab verdanken wir Herrn Dr. M. SUTTER.

Tabelle 3. *Farbreaktionen der basischen Peptide*

Farbstest	Zizyphin	Dihydrozizyphin	Zizyphinin
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (50-proz.) auf Silicagel-Dünnschichtplatte	violettbraun	–	violettbraun
Tetranitromethan auf Tüpfelplatte	dunkelbraun	braun	dunkelbraun
Kalium-jodplatinat auf Papier (modif. DRAGENDORFF)	rosa	rosa	rosa
Kaliumjodat auf Papier im UV.-Licht betrachtet	blau	–	blau

Negativ für alle drei Basen sind die folgenden auf Papier ausgeführten Farbsteste: PAULY-, EHRlich-, 2,6-Dichlorchinonchlorimid-, Isatin-, Vanillin-, Zimtaldehyd-, Ninhydrin-Probe.

(Vgl. Firmenschrift der E. MERCK AG, Darmstadt: Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papierchromatographie)

### Experimenteller Teil

1. *Gewinnung der Betulinsäure.* – a) *Durch Totalextraktion mit Methanol:* 4,7 kg pulverisierte Wurzelrinde von *Zizyphus oenoplia* MILL. wurden nach gründlicher Durchmischung mit 7 l 90-proz. wässrigem Methanol in einen Perkulator eingefüllt und mit reinem Methanol erschöpfend extrahiert. Aus 65 l Perkolat erhielt man durch Einengen im Vakuum 1,5 l braunes Konzentrat, das nach mehrstündigem Stehen 96,7 g eines teilweise kristallisierten rotbraunen Niederschlages bildete. Dieser wurde abgenutzt und in trockenem Zustand in einer Papierhülle mit Äther unter Rückfluss erschöpfend extrahiert. Der Extrakt lieferte 55 g hellgelben Trockenrückstand. Diesen löste man in 1,2 l Methanol-Äther-(1:1)-Gemisch und gab bis zur deutlichen alkalischen Reaktion 2<sub>N</sub> methanolische Natronlauge (~ 45 ml) zu. Dann wurde im Vakuum auf ca. 100 ml eingeeengt und kurze Zeit auf 60° erwärmt, wobei das Natriumsalz der Betulinsäure auskristallisierte. Man nutschte den dickflüssigen Kristallbrei noch in warmem Zustand ab, wusch den Filterkuchen mit einem Gemisch aus 3 Teilen Äther und einem Teil Methanol nach und erhielt 14 g farbloses Natriumbetulinat. Dieses wurde in möglichst wenig Methanol gelöst (ca. 450 ml) und mit 7<sub>N</sub> methanolischer Salzsäure (ca. 6 ml) angesäuert, wobei nach teilweisem Einengen der Lösung total 11,5 g reine Betulinsäure kristallisierten. Die Mutterlauge und der in Äther unlösliche Teil des ersten Rohkristallisates wurden vereinigt, im Vakuum getrocknet und ergaben 598 g dunkelrotbraunes Harz, das nach dem auf Seite 1804 angegebenen Schema fraktioniert wurde.

b) *Durch selektive Vorextraktion mit Äther:* 100 g feingemahlene, lufttrockene Wurzelrinde von *Z. oenoplia* wurden im Rückflussextraktor (Papierhülle) 5 Std. mit Äther (500 ml vorgelegt) extrahiert und die Extraktlösung anschliessend im Vakuum zur Trockne eingedampft. Man erhielt 1,19 g hellgelben Trockenrückstand. Daraus wurde kristallisiertes Natriumbetulinat (0,47 g) durch

Lösen in 30 ml Äther-Methanol-Gemisch, Zugabe von 1 ml 2N methanolischer Natronlauge, Einengen, Erwärmen und Abnutschen des Kristallbreis gewonnen. Aus dem Salz liess sich mittels methanolischer Salzsäure 0,32 g Betulinsäure freisetzen, die nach einmaligem Umkristallisieren aus Äther-Methanol-Gemisch bei 318–320° schmolz. Der daraus erhaltene Betulinsäure-methyl-ester konnte im Dünnschicht-Chromatogramm (System: Chloroform) nach Behandlung mit 50-proz. Schwefelsäure als brauner Fleck mit dem Rf-Wert von 0,30 identifiziert werden. Die mit Äther vorextrahierte Wurzelrinde wurde anschliessend in der im vorangehenden Beispiel geschilderten Weise mit Methanol (mit 90-proz. Methanol befeuchtet) perkoliert, wobei man 12 g rotbraunes Harz zur weiteren Fraktionierung erhielt.

2. *Fraktionierung der Mutterlaugenprodukte der Betulinsäure* (vgl. Schema 1). 50 g rotbraunes Harz wurden in einer Reibschale pulverisiert und mit 500 ml Gemisch aus gleichen Volumenteilen Methanol und 12-proz. wässriger Essigsäure bei Zimmertemperatur 1 Std. verrührt. Der pulverige, dunkelbraune Rückstand wurde durch Abnutschen getrennt (560 mg). Er war vollständig unlöslich und wurde verworfen.

Das Filtrat wurde 15 Std. mit Chloroform (1,5 l vorgelegt) kontinuierlich extrahiert; darauf wurde die Extraktlösung abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 6,12 g helles Harz (Acetat der schwachen Basen), das sich in chlorierten Kohlenwasserstoffen, niederen Alkoholen und Äther leicht, in Benzol wenig und in Petroläther<sup>26)</sup> nicht löste. Im Dünnschichtchromatogramm mit dem System Benzol-Aceton-(1:1) waren nach Besprühen mit 50-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Heizen in der Hauptsache 2 braune Flecke mit den Rf-Werten 0,23 und 0,45 sichtbar, die dem Zizyphinin und dem Zizyphin zugeschrieben werden konnten. Ihre Trennung und Isolierung wird in Abschnitt 3 beschrieben.

Die mit Chloroform erschöpfend extrahierte wässrig-essigsäure Lösung wurde mit 6,2 ml konz. Ammoniumhydroxidlösung auf pH 7,2 gebracht und in gleicher Weise mit Chloroform erschöpfend extrahiert. Es bildete sich eine beträchtliche Menge eines braunen, unlöslichen Niederschlages, der die Abtrennung der Chloroformschicht erschwerte. Der Trockenrückstand aus dem Chloroform-extrakt betrug nur 26 mg und zeigte unter UV.-Licht im Dünnschichtchromatogramm (Benzol-Aceton-(1:1)) den allen Fraktionen gemeinsamen blaugrauen Fleck am Auftropfpunkt, der erfahrungsgemäss von einem Abbauprodukt herrühren dürfte. Das braune Präzipitat wurde abgetrennt (Trockengewicht 1,42 g) und die wässrige Schicht durch Lyophilisation in den Trockenzustand übergeführt (43 g). Die weitere Bearbeitung der letzten Fraktion wird in Abschnitt 5 beschrieben.

3. *Isolierung der schwach basischen Peptide Zizyphin und Zizyphinin*. 6,12 g rohe Acetate wurden in 300 ml Gemisch Äther-Methylenchlorid-3:1 (v/v) unter Zugabe von 2 ml Wasser gelöst und durch zweimaliges Ausschütteln bei 0° mit je 100 ml 1N Natronlauge in die Basen übergeführt. Nach viermaligem Waschen der organischen Phase mit Wasser, Trocknen mit entwässertem Kaliumcarbonat und Eindampfen im Vakuum erhielt man 3,43 g Basen als zähes Öl.

Man löste die Basen in 55 ml abs. Äther und gab 15,1 ml 10-proz. ätherische Oxalsäurelösung zu, worauf sich ein hellgelber, pulveriger Niederschlag bildete, der abgetrennt wurde, nach dem Trocknen 3,7 g wog und bei 140° schmolz. Im Dünnschichtchromatogramm zeigte er neben dem Fleck am Auftropfpunkt die beiden für Zizyphin und Zizyphinin charakteristischen Flecke von Rf 0,45 und 0,23, welche in den Mutterlaugen der Oxalatfällung fehlten.

Aus dem Oxalatniederschlag wurden die Reinpeptide durch Chromatographie der Basen gewonnen. Dazu löste man 60 g Oxalat in 3 l Äther und 200 ml Wasser und führte es durch Ausschütteln bei 0° mit 400 ml 1N Natronlauge in die Basen über. Nach der Trennung der Schichten wurde die wässrige Phase noch zweimal mit je 500 ml Äther extrahiert. Alle Ätherphasen wurden zweimal mit je 400 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Kaliumcarbonat und dem Eindampfen im Vakuum erhielt man 45,05 g gelblichen Schaum. Das Basengemisch wurde in 100 ml Benzol gelöst, die Lösung mit 100 ml Petroläther<sup>26)</sup> versetzt (schwache Trübung) und auf eine Säule von 1,35 kg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aktivität II, neutral; Durchmesser 5,8 cm, Höhe 47 cm) gegeben. Dann wurde nach dem Schema S. 1809 in Fraktionen zu 1 l eluiert.

Zizyphin wurde isoliert, indem man 1 g amorphen, farblosen Schaum der Sammelfraktion 4–12 in 40 ml Äther löste, filtrierte und unter Rühren langsam 40 ml Petroläther<sup>26)</sup> dazu gab.

<sup>26)</sup> Es wurde Petroläther vom Sdp. 50° bis 70° verwendet.

Frakt. 1/2 Petroläther/Benzol 1:1		
Frakt. 3/4 Benzol	0,312 g	} nur <i>Zizyphin</i> enthaltend (nach Dünnschichtchromatogramm)
Frakt. 5–7 Benzol/Methylenchlorid 1:1	10,50 g	
Frakt. 8–11 Methylenchlorid	22,38 g	} Basengemisch
Frakt. 12 Methylenchlorid/Chloroform 9:1	2,52 g	
Frakt. 13 Methylenchlorid/Chloroform 9:1	1,62 g	} nur <i>Zizyphinin</i> enthaltend
Frakt. 14 Methylenchlorid/Chloroform 1:1	2,39 g	
Frakt. 15 Methylenchlorid/Chloroform 1:1	1,17 g	
Frakt. 16/17 Chloroform	0,4 g	

Darauf engte man die Lösung bei schwachem Vakuum<sup>27)</sup> und 30° auf 10 ml ein, wobei ein mikrokristallines Pulver (760 mg) entstand. Schön ausgebildete Kristalle liessen sich gewinnen, indem man eine Lösung von 150 mg des trockenen Schaumes in 1 ml Methanol in ein Zentrifugengläschen pipettierte und im Stickstoffstrom bei Zimmertemperatur die Hälfte des Lösungsmittels abdampfte. Dann impfte man an und liess die Lösung 30 Min. bei 0° stehen. Es entstanden dabei sehr schöne Kristallplättchen, die abfiltriert und mit 2 ml eiskaltem Methanol gewaschen wurden. Im Hochvakuum 17 Std. bei 50° getrocknet, besass das Präparat die in der Tabelle 1 angegebenen Eigenschaften.

*Zizyphinin* erhielt man durch analoge Behandlung von 0,5 g farblosem Schaum aus Fraktion 14.

4. *Derivate des Zizyphins*. – a) *Zizyphin-hydrochlorid*: 613 mg reine Base (ca. 1 mMol) wurden in 20 ml frisch destilliertem Äther gelöst und unter Rühren langsam mit 1,4 ml 0,7N methanolischer Salzsäurelösung versetzt. Es entstand sofort eine ölige Fällung, die mit 5 ml Methylenchlorid vollständig in Lösung gebracht werden konnte. Dann wurden unter Rühren 15 ml Petroläther zugegeben, worauf die Lösung in einen 100-ml-Schliffkolben gegeben und im Wasserstrahlvakuum teilweise eingedampft wurde, bis leichte Trübung einsetzte. Dann wurde die Lösung bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei dünne, rechteckige Plättchen ausfielen. Nach Filtrieren, Waschen mit Äther und 3 stündigem Trocknen bei 12 Torr und 40° erhielt man 400 mg Kristalle vom Smp. 184–184,5°. Zur Analyse trocknete man während 17 Std. bei 60°/0,01 Torr.

b) *Zizyphin-hydrojodid*: 120 mg Base (0,196 mMol) wurden in 2 ml Methylenchlorid gelöst und unter Rühren mit 0,62 ml 0,32N methanolischer Jodwasserstofflösung (0,2 mMol) versetzt. Darauf wurden zuerst 3 ml Petroläther, dann tropfenweise unter Rühren ca. 4 ml Äther bis zum Eintreten einer leichten Trübung zugegeben. Es entstanden kleine, farblose Plättchen, die nach Filtration aus Methylenchlorid-Petroläther-Äther-(2:3:4)-Gemisch bei Zimmertemperatur umkristallisiert wurden. Nach der Filtration wurden die Kristalle mit 5 ml des gleichen Gemisches auf der Nutsche gewaschen.

Alle Operationen wurden unter Stickstoff durchgeführt. Zur Analyse trocknete man 17 Std. bei 60°/0,01 Torr.

c) *Zizyphin-oxalat*: 123 mg reine Base (ca. 0,2 mMol) wurden in 10 ml Methylenchlorid gelöst und mit einer Lösung von 18 mg wasserfreier Oxalsäure (0,2 mMol, analysenrein) in 4 ml Methylenchlorid und 6 ml Äther versetzt. Nach einigen Min. setzte die Kristallisation ein, wobei sich Stäbchen und Prismen bildeten<sup>28)</sup>. Nach dreimaligem Umkristallisieren erhielt man 70 mg Substanz vom Smp. 140,5°. Zur Analyse wurde 17 Std. bei 60°/0,02 Torr getrocknet.

d) *Zizyphin-perchlorat*: 576 mg Base (0,943 mMol) wurden in 15 ml Methylenchlorid gelöst und unter stetem Rühren langsam mit einer Lösung von 0,943 mVal Perchlorsäure in 21 ml eines Wasser-Äthanol-Methylenchlorid-(1:10:10)-Gemisches versetzt. Kurz darauf wurde die Lösung im Vakuum bei 40° eingedampft und der ölige Rückstand in 5 ml Äthanol aufgenommen. Nach dem Animpfen entstanden feine weisse Nadeln, die abfiltriert, mit 20 ml kaltem Äthanol gewaschen und getrocknet wurden (400 mg). Smp. (offene Glaskapillare, nicht korrigiert) 268–269° (Zers., Braunfärbung). Zur Analyse gelangte ein 17 Std. im Hochvakuum bei 40° getrocknetes Präparat.

e) *Freisetzung des Zizyphins aus dem Perchlorat*: 200 mg Perchlorat wurden in einem Gemisch von 50 ml Äther und 50 ml Wasser gelöst. Dann wurde durch Zutropfen von 0,1N wässriger Natronlauge unter Rühren das pH auf 10,5 eingestellt, wonach die zwei Phasen sogleich im Scheidetrichter getrennt wurden. Die ätherische Schicht wurde noch zweimal mit je 50 ml dest. Wasser

<sup>27)</sup> Beim Abdampfen des Äthers bei gewöhnlichem Druck erhielt man stets ölige Niederschläge.

<sup>28)</sup> Da keine Misch-Smp.-Depression zwischen den zwei Formen beobachtet werden kann, dürfte es sich hier um eine Polymorphie-Erscheinung handeln.

gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des Äthers und Trocknen bis zur Gewichtskonstanz im Wasserstrahlvakuum bei 40° erhielt man 130 mg Substanz. Diese wurde an 10 g Aluminiumoxid (Aktivität: I, neutral, WOELM) schnell chromatographiert. Zuerst eluierte man mit 300 ml Petroläther-Benzol-(1:1)-Gemisch, dann mit 100 ml Benzol; die Base wurde erst mit 150 ml Benzol-Methylenchlorid-(1:1)-Gemisch eluiert. Der Rückstand der eingedampften Fraktion wurde in 10 ml Äther gelöst und wie schon beschrieben mit 10 ml Petroläther versetzt. Nach Abdampfen des Äthers bei gelindem Vakuum erhielt man 80 mg einer mikrokristallinen Fällung. Diese Substanz verhält sich im Dünnschichtchromatogramm einheitlich. Auch die Infrarot- und Kernresonanz-Spektren (in Methylenchlorid bzw. Deuteriochloroform) waren mit denjenigen des Zizyphins deckungsgleich.

f) *Dihydrozizyphin-perchlorat*: 122 mg Zizyphin (0,2 mMol) wurden in 20 ml Feinsprit gelöst, mit 50 mg vorhydriertem Platinkatalysator versetzt und bei Zimmertemperatur und Normaldruck hydriert. Nach Aufnahme von 1 Mol. Wasserstoff (45 Min.) wurde der Katalysator abfiltriert und der Alkohol abgedampft. Das zurückbleibende dickflüssige Öl wurde in 3 ml alkoholfreiem Chloroform aufgenommen und das Lösungsmittel anschliessend im Vakuum abgedampft, wobei ein farbloser, fester Schaum entstand, der im Dünnschichtchromatogramm (System: Chloroform-Aceton-[7:3], Indikator: Kalium-jodplatinat, 20 Min. bei 100°) nur einen Fleck mit dem Rf-Wert 0,25 zeigte. Das so gewonnene Dihydrozizyphin wurde zur Kontrolle nochmals in Feinsprit gelöst und mit frischem vorhydriertem Platinkatalysator unter Wasserstoff geschüttelt: es fand keine Wasserstoffaufnahme statt. Durch Aufarbeiten wie oben beschrieben erhielt man unverändertes Ausgangsmaterial zurück.

Eigenschaften des Dihydrozizyphins:  $[\alpha]_D^{26} = -188,3^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$  in Chloroform).  $pK_s = 5,88^{21}$ . Ultraviolettpektrum: Maximum bei 292 m $\mu$  ( $\epsilon = 3300$ ). Infrarotspektrum (in Methylenchlorid): im Carbonylbereich Absorptionsbanden bei 5,95  $\mu$  und 6,05  $\mu$ ; der Rest deckt sich fast vollständig mit dem Spektrum des Zizyphins. Protonenresonanzspektrum<sup>25</sup>): 50/s + 54/s + 57/s + 60/s + 72/s + 80/s + 109/b + 136/s + 155/s + 160/s (total 32); 188/b + 226/s (total 10); 260/b(4); 324/b(1); 386/b(1); 404/s + 410/b (total 3).

Zur Darstellung des kristallisierten Perchlorates wurden 123 mg Base (0,2 mMol) in 5 ml Methylenchlorid gelöst und langsam unter Rühren mit einer Lösung von 0,2 mVal Perchlorsäure in 3,9 ml eines Wasser-Äthanol-Methylenchlorid-(1:10:10)-Gemisches versetzt. Nach dem Eindampfen an der Wasserstrahlpumpe (40°) wurde der ölige Rückstand mit 2 ml Äthanol durch kurzes Erwärmen auf dem Wasserbad (40°) gelöst; nach dem Abkühlen auf 30° wurden noch 3 ml Äther unter Rühren bis zur leichten Trübung zugegossen. Nach weiterem Abkühlen schied sich lange farblose Nadeln aus (70 mg). Das dreimal aus Alkohol-Äther-Gemisch umkristallisierte Perchlorat schmolz bei 169–170°. Zur Elementaranalyse wurde eine Probe 17 Std. bei 0,02 Torr/60° getrocknet.

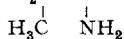
$C_{33}H_{52}O_{10}N_5Cl, \frac{1}{2}H_2O$  (723,26) Ber. C 54,80 H 7,39 Cl 4,90% Gef. C 54,95 H 7,21 Cl 4,48%  
g) *Massenspektren*<sup>29)</sup> der über die Perchlorate gereinigten Peptide. Die hervorstechenden Spitzen liegen bei folgenden *m/e*-Zahlen:

Zizyphin: 611, 568, 554, 496, 411, 384, 372, 357, 356, 277 (= 554/2), 235, 216, 193, 192, 191, 114<sup>30)</sup>, 100, 70<sup>32)</sup>, 57<sup>33)</sup>, 44<sup>34)</sup>, 28<sup>35)</sup>.

<sup>29)</sup> Die Massenspektren wurden mit einem Massenspektrometer Modell CH 4 der ATLAS-WERKE AG., Bremen, ausgerüstet mit Ofenionenquelle und Sekundärelektronenvervielfacher, aufgenommen.

<sup>30)</sup> Siehe auch: K. BIEMANN, J. SEIBL & F. GAPP, J. Amer. chem. Soc. 83, 3795 (1961).

<sup>31)</sup>  $CH_3CH_2CH-CHCO^{\oplus}$



<sup>32)</sup>  $CH_3-CH_2-C=CH_2$



<sup>33)</sup>  $CH_3-CH_2-CH^{\oplus}$



<sup>34)</sup>  $CO_2$

<sup>35)</sup>  $CH_2=CH_2$

Zizyphinin: 597, 554, 498, 455, 426, 385, 358, 216, 202, 191, 114<sup>31</sup>).

Dihydrozizyphin: 673, 556, 499, 457, 428, 386, 360, 278 (= 556/2), 245, 235, 218, 201, 194, 193, 192, 189, 188, 114<sup>31</sup>).

5. *Aufarbeitung der wässrigen Phase aus der Chloroformextraktion bei pH 7,2.* 1,0 g braunes Lyophilisat wurde in 4,0 ml Wasser gelöst und mit 40 ml Methanol verdünnt, wobei sich die violettbraune Lösung leicht trübte. Man gab 1 g Carbo adsorbens (Ph. H.; SIEGFRIED) zu und rührte 2 Std. bei Zimmertemperatur. Dann wurde durch Hyflo filtriert und das Filtrat noch viermal mit der gleichen Menge Carbo adsorbens behandelt. Das resultierende Filtrat war wasserklar und ergab nach dem Eindampfen 250 mg hellen Schaum. Im Dünnschichtchromatogramm (System: Dioxan-Wasser-(9:1<sup>36</sup>)) war nach der Behandlung mit Schwefelsäure nur ein brauner Fleck mit Rf-Wert 0,5 sichtbar<sup>37</sup>). Das Material enthielt 2,90% Stickstoff und 8,56% Chlor<sup>38</sup>). Das Material wurde von Ammoniumchlorid mit Hilfe eines Kationen-Anionen-Austauscher-Gemisches befreit. Dazu wurden 500 mg Material, in 50 ml Wasser gelöst, auf eine Mischbettsäule aus 2 ml Amberlite IR 120 und 1,65 ml Amberlite IRA 410 gegeben<sup>39</sup>) und wie folgt eluiert.

Fraktion	Elutionsmittel	Gewicht	Bemerkungen
1	250 ml H <sub>2</sub> O	259 mg	farbloses Öl
2	40 ml 0,1N HCl-Lsg.	85 mg	Öl
3–8	5450 ml H <sub>2</sub> O	34 mg	Öl

Die erste Fraktion enthielt 11,8% D-Glucose<sup>40</sup>), 23,4% D-Fructose<sup>41</sup>) und 47,3% Saccharose, wobei letztere aus der gesättigten methanolischen Lösung kristallin erhalten wurde. Die optische Drehung der Mutterlauge aus der Saccharosekristallisation betrug  $[\alpha]_D = -4^\circ$ . Die drei genannten Zucker liessen sich in den Systemen *n*-Propanol-Äthylacetat-Wasser-(7:1:2) und Äthylacetat-Pyridin-Wasser-(2:1:2) papierchromatographisch nachweisen. Darüber hinaus konnte auf die Anwesenheit eines nicht identifizierten, reduzierenden, vergärbaren zusätzlichen Zuckers an Hand eines vierten Flecks mit  $R_S = 0,09$  bzw. 0,13 ( $S =$  Bromphenolblau) geschlossen werden.

Die zweite Fraktion zeigte nach der Papierchromatographie in den angegebenen Systemen keine reduzierende Substanzen, nach einer zusätzlichen partiellen Vergärung des Chromatographie-Streifens jedoch konnte man durch Silberreagens die Anwesenheit dialysierbarer (Cellulose-schlauch von 24 Å Porenweite) Polysaccharide mit den  $R_S$ -Werten 0,00; 0,09; 0,18 (System: *n*-Propanol-Äthylacetat-Wasser-[2:1:2]) feststellen.

#### SUMMARY

Two new basic peptides, Zizyphin ( $C_{33}H_{49}O_8N_5$ ) and Zizyphinin ( $C_{32}H_{47}O_8N_5$ ), have been isolated from the root bark of *Zizyphus oenoplia* MILL.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel  
Pharmazeutische Abteilung

Caius Research Laboratory, St. Xavier's College, Bombay

<sup>36</sup>) Absorptionsmittel: Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie MERCK-Darmstadt, nach E. STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958).

<sup>37</sup>) Fructose, Glucose, Saccharose zeigen im selben System Flecke mit den gleichen Rf-Werten.

<sup>38</sup>) Das Ammonium-Ion stammt aus der Neutralisation der Essigsäure, während das Chlor-Ion aus der Oxydation des Extraktionschloroforms stammen dürfte ( $CHCl_3 + \text{«O»} = COCl_2 + HCl$ ).

<sup>39</sup>) Der Kationenaustauscher wurde mit Salzsäure, der Anionenaustauscher mit Natronlauge aktiviert, darauf wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, bis die Leitfähigkeit des Eluates den Wert  $5,6 \cdot 10^{-6} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$  erreicht hatte.

<sup>40</sup>) Bestimmt mit dem Glucose-oxydase-Test nach A. ST. G. HUGGETT & D. A. NIXON, Biochem. J. 66, 12P (1957). Die Testlösungen wurden von der Firma C. F. BOEHRINGER, Mannheim, bezogen.

<sup>41</sup>) Bestimmt nach J. H. ROE, J. biol. Chemistry 107, 15 (1934); 178, 839 (1949).