

## ÜBER ZWEI KÄMPFEROLGLYKOSIDE DES SUMPFSCHACHTELHALMES (*EQUISETUM PALUSTRE*)

SIEGFRIED BECKMANN und HANS GEIGER

Aus dem Chemischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule, Stuttgart-Hohenheim

(Received 27 November 1962)

**Zusammenfassung**—Aus *Equisetum palustre* wurde Kämpferol-3-rhamnoglucosid-7-glucosid und ein Kämpferol-3,7-diglykosid mit insgesamt 5 Glucose- und Rhamnoserenen isoliert, deren vollständige bzw. partielle Konstitutionsaufklärung beschrieben wird.

**Abstract**—Kaempferol-3-rhamnosylglucoside-7-glucoside and a partly characterized kaempferol-3,7-diglycoside (with 5 glucose and rhamnose residues) have been isolated from marsh horse-tail (*Equisetum palustre*).

Bei früheren Untersuchungen über Inhaltsstoffe des Sumpfschachtelhalmes (*Equisetum palustre*) ist das Vorkommen von Flavonolglykosiden in dieser Pflanze festgestellt worden.<sup>1</sup> Es ist uns nun gelungen, aus dem wasserlöslichen Teil des Methanolextraktes aus den oberirdischen Teilen der Pflanze durch Chromatographie an Polyamidpulver<sup>2</sup>, zwei Glykoside (A und B) in reinem Zustand zu isolieren (Tab. 1).

TABELLE 1. R<sub>F</sub>-WERTE VON KÄMPFEROL UND KÄMPFEROLGLYKOSIDEN

Substanz	Fließmittel						Fluoreszenz		
	Wasser	Essigsäure/Wasser				But./ Eg./H <sub>2</sub> O 4 : 1 : 5	Ester/ Am./H <sub>2</sub> O 10 : 2 : 3	unbe- handelt	AlCl <sub>3</sub> *
		1 : 9	2 : 8	4 : 6	6 : 4				
A	0,63	0,74	0,80	0,90	0,91	0,10	0,00	dunkler Fleck	stark grün
B	0,47	0,61	0,72	0,83	0,89	0,15	0,06	"	"
IV	0,23	0,38	0,55	0,76	0,82	0,43	0,48	"	"
IV Lit. <sup>a</sup>							0,43	0,45	
II	0,00	0,06	0,18	0,44	0,60	0,46	0,55	matt gelbgrün	"
III	0,00	0,11	0,28					"	"
I	0,00	0,01	0,07	0,25	0,46	0,78	0,92	"	"
I Lit. <sup>a</sup>						0,78	0,91		

But. = *n*-Butanol, Eg. = Essigsäure, Ester = Athylacetat, Am. = Ameisensäure; alle Chromatogramme auf Schleicher-Schüll-Papier 2045 b gew. aufsteigend entwickelt.

\* Mit 1-proz. AlCl<sub>3</sub>.6 H<sub>2</sub>O in Methanol besprüht und getrocknet;

† NA = mit 1-proz. Naturstoffreagens A (Diphenylborsäure-β-aminoäthylester) in Methanol besprüht.

Bei der Hydrolyse mit verd. Salzsäure lieferten beide Heteroside als Aglykon Kämpferol (I), das papierchromatographisch, durch Mischschmelzpunkt, sowie durch das Ergebnis der Alkalischmelze, die Phloroglucin und *p*-Hydroxybenzoësäure lieferte, identifiziert wurde; ferner wurde in beträchtlicher Menge Kämpferol-7-glucosid (II) erhalten, das mit dem Populin genannten Kämpferol-7-glucosid aus *Thespesia populnea*<sup>4</sup> identisch sein

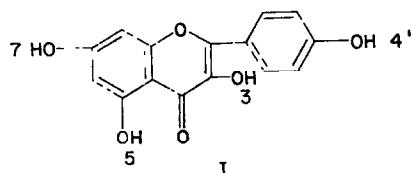
<sup>1</sup> HANS KERN, *Dissertation Techn.* Hochschule Stuttgart 1957.

<sup>2</sup> L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und W. LEEB, *Naturwissenschaften* 44, 513 (1957).

<sup>3</sup> L. HÖRHAMMER, H. J. GEHRMANN und L. ENDRES, *Arch. Pharm.* 292/64, 113 (1959).

<sup>4</sup> K. NEELAKANTAM, P. S. RAO und T. R. SESHADRI, *Proc. Indian Acad. Sci.* 17A, 26 (1943); P. R. RAO und T. R. SESHADRI, *ibid.* 24A, 456 (1946).

dürfte. A lieferte außerdem noch in sehr geringer Menge, die eine präparative Abtrennung nicht erlaubte, ein weiteres 7-Glykosid (III), das im Papierchromatogramm schneller wanderte als II und wohl ein Kämpferol-7-biosid ist.



Da Flavonol-7-glucoside sich mit Säure meist schlecht spalten lassen<sup>5</sup> so dass mit einer teilweisen Zersetzung des Zuckeranteiles zu rechnen war, haben wir die Totalhydrolyse der beiden Heteroside A und B mit Cellulase aus *Aspergillus niger*, einem komplexen Gemisch verschiedener Glykosidasen, das durch Gel-Filtration an Sephadex G-25 von Zuckern befreit war, durchgeführt. Dabei lieferten A und B als Aglykon nur I. Bei A entfallen auf 1 Mol (I), 5 Mol Zucker; bei B, 3 Mol Zucker. Die Zucker wurden bei beiden Glykosiden papierchromatographisch als Glucose und Rhamnose identifiziert (Tab. 2), wobei erstere in beiden Fällen überwog.

TABELLE 2. R<sub>F</sub>-WERTE DER ZUCKER

Substanz	Phenol/Wasser*			n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4 : 1 : 5 2043 b		
	2043 b	2045 b	gew.†			
Zucker aus A	0,39	0,64	0,51	0,74	0,15	0,40
Zucker aus B	0,39	0,64	0,51	0,74	0,15	0,40
Zucker aus IV	0,39	0,64	0,51	0,74	0,15	0,40
Zucker aus II	0,39			0,51	0,15	
Glucose	0,39			0,51	0,15	
Rhamnose		0,64		0,74		0,40

Die Chromatogramme wurden auf Schleicher-Schüll-Papier 2043 b bzw. 2045 b gew. aufsteigend entwickelt. Die Sichtbarmachung der Zucker erfolgte mit Anilinhydrogenphthalat.

\* 80 : 20 (G : V) + 1% konz. NH<sub>3</sub> + 0,5% Äthylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz.

† Dieses säuregewaschene Papier zeigte die bei phenolhaltigen Fließmitteln meist auftretenden stark gefärbten Fronten nur in sehr geringem Masse, doch lagen die R<sub>F</sub>-Werte wesentlich höher als bei nicht gewaschenem Papier.

Süssmandelemulsin ist auf A ohne Wirkung, während es B in Glucose und Kämpferol-3-rhamnoglucosid (IV), sowie II in Glucose und I spaltet. IV lässt sich, da es keinen Zucker mehr in 7-Stellung enthält, ohne Schwierigkeit mit verd. Salzsäure in je ein Mol (I), Glucose und Rhamnose spalten. Auf Grund seiner Zusammensetzung, seines Schmelzpunktes und seiner R<sub>F</sub>-Werte dürfte IV mit dem Kämpferol-3-rhamnoglucosid identisch sein, das Hörhammer und Mitarbeiter<sup>3</sup> aus Blüten von *Aesculus hippocastanum* isoliert haben und das schon früher mehrfach aufgefunden worden ist. Die Tatsache, dass die Rhamnoglucose durch Emulsin nicht abgespalten wird, dürfte damit zusammenhängen, dass es sich um Rutinose handelt, was auch Hörhammer<sup>3</sup> auf papierchromatographischem Wege wahrscheinlich machen konnte, und Emulsin am Hydroxyl 6 des Zuckers substituierte

<sup>5</sup> Vgl. z.B. A. G. PERKIN, J. chem. Soc. 95, 2181 (1909); M. HASFGAWA, J. org. Chem. 24, 408 (1959).

Glucoside nur schwer spaltet.<sup>6</sup> Im Glykosid A liegen offenbar alle Zucker in einer für Emulsin nicht angreifbaren Verknüpfung vor.

Was nun die Verknüpfungsstelle der Zucker am Kämpferol betrifft, so spricht die Tatsache, dass die Glykoside A, B und IV auf dem Papierchromatogramm beim Betrachten im UV-Licht als dunkel Flecke erscheinen, für eine glykosidische Bindung in 3-Stellung von I; ferner zeigt die schwache Eigenfluoreszenz von II, dass in ihm die Glykosidbindung an einer anderen als der 3-Stellung angreift.<sup>7</sup> Mithin müssen A und B Diglykoside sein, während IV, das ja bei der Hydrolyse kein II mehr liefert, ein Monoglykosid ist, ebenso wie II. Es bleibt nun noch zu beweisen, ob das zweite Zuckermolekül in A und B mit dem Hydroxyl 7 oder 4' verknüpft ist. Dies gelang durch Methylierung mittels Diazomethan und anschliessende enzymatische Hydrolyse mit Cellulase. Dabei entstand sowohl aus A als auch aus B unter anderem Kämpferid (Kämpferol-4"-methyläther), das papierchromatographisch nachgewiesen wurde (Tab. 3). Ausserdem waren auf dem Chromatogramm noch Kämpferol, sowie zwei stark gelb fluoreszierende Flecke zu erkennen, deren Fluoreszenzintensität sich weder durch Besprühen mit Aluminiumchlorid verstärken, noch durch Besprühen mit Äthylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz schwächen liess, und bei denen es sich daher wohl um Kämpferol-5-methyläther und 5,4"-Dimethyläther handelte.

TABELLE 3. R<sub>F</sub>-WERTE UND FLUORESENZVERHALTEN DER AUS A, B BZW. ROBININ DURCH METHYLIERUNG MIT DIAZOMETHAN UND NACHFOLGENDE HYDROLYSE GEWONNENEN PRODUKTE

R <sub>F</sub>	unbesprührt	Fluoreszenz besprührt mit		Kämpferol
		AlCl <sub>3</sub>	NA*	
0,46	matt gelbgrün	stark grün	stark gelbgrün	Kämpferol
0,53	hell grüngebl	unverändert	unverändert	
0,62	matt gelbgrün	stark grün	stark gelbgrün	Kämpferid
0,71	hell grüngebl	unverändert	unverändert	
0,87	blau	blau	blau	
0,95	blau	blau	blau	

Papier Schleicher-Schüll 2045 b gewaschen. Fließmittel Eisessig/Wasser 6 : 4.

\* vgl. Tab. 1.

Es ist bekannt, dass in Lösung nur solche Flavonole fluoreszieren, die entweder in 5-Stellung kein Hydroxyl tragen, wie z.B. Fisetin oder Robinetin, oder deren 5-Hydroxylgruppe veräthert ist,<sup>8</sup> während die Flavonole mit freier 5-Hydroxylgruppe nur in Form ihrer Chelatkomplexe, z.B. mit Aluminiumsalzen, fluoreszieren. Wir fanden nun, dass die auf Papierchromatogrammen meist beobachtete starke Fluoreszenz dieser Flavonole mit freier 5-Hydroxylgruppe auf Chelatbildung mit den Verunreinigungen des Papiers zurückzuführen ist und sich durch Besprühen mit einer 0,1 m Lösung von Äthylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz bis auf eine geringe Restfluoreszenz löschen lässt. Von vornherein verhindern lässt sich die starke Fluoreszenz der 5-Hydroxyflavonole durch Verwendung säuregewaschener Chromatographiepapiere, auf denen sie nur als matt fluoreszierende Flecke erscheinen, die sich jedoch gut von den die Eigenfluoreszenz des Papiers löschen Flavonen ohne oder mit besetzter Hydroxylgruppe 3 unterscheiden.

<sup>6</sup> B. HELFERICH, S. GRÜNLER und A. GNÜCHTEL, *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's* **248**, 85 (1937).

<sup>7</sup> H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955, S. 207.

<sup>8</sup> R. KUHN und I. LöW, *Ber. deut. Chem. Ges.* **77**, 212 (1944).

Die Chromatogramme der hydrolysierten Methylierungsprodukte von A und B zeigten ferner noch blau fluoreszierende Flecke, die auf weitergehende Umsetzungen der Glykoside mit Diazomethan hindeuteten. Weil bei den geringen uns zur Verfügung stehenden Substanzmengen an eine präparative Aufarbeitung dieser Mischungen nicht zu denken war, haben wir zum Vergleich das Robinin (Kämpferol-3-rhamnogalactosid-7-rhamnosid) unter denselben Bedingungen methyliert und hydrolysiert. Da die hydrolysierten Methylierungsprodukte von Robinin, A und B papierchromatographisch vollkommen identisch waren, war bewiesen, dass A und B 3,7-Diglykoside sind.

Aus dem Dargelegten folgt, dass II Kämpferol-7-glucosid, IV Kämpferol-3-rhamnoglucosid und B Kämpferol-3-rhamnoglucosid-7-glucosid ist. Über A lässt sich nur aussagen, dass seine 5 Zuckermoleküle ebenfalls mit den Hydroxylgruppen 3 und 7 des Kämpferols verknüpft sein müssen, und zwar muss es in 3-Stellung mindestens einen und in 7-Stellung, wegen der Bildung von III, mindestens 2 Zucker tragen, wovon der direkt mit I verbundene wegen der Bildung von II Glucose ist; mindestens ein weiterer der 5 Zuckerreste ist Rhamnose.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir vielmals für die finanzielle Unterstützung der Arbeit, Herrn Prof. Hörhammer, München, und Frau Dr. I. Löw, Heidelberg, für die Überlassung von Vergleichspräparaten.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

##### *Isolierung der Kämpferolglykoside A und B*

500 g lufetrockenen, feingemahlenen Sumpfschachtelhalms werden in einem Durchflussextraktor erst zur Entfernung von Lipoiden 3 Tage mit Petroläther (Siedebereich 30–40°) und danach 2 Tage mit 90 proz. Methanol extrahiert. Der filtrierte Methanolextrakt wird im Vakuum auf 1 l. eingeengt, und mit 1 l. Wasser versetzt, wobei sich das Chlorophyll, sowie harzige Beimengungen abscheiden. Das klare Filtrat wird wieder auf 1 l. eingeengt, filtriert und die klare Lösung nunmehr ohne Rücksicht auf weitere Abscheidungen im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird mit 10 ml 90-proz. Methanol einige Stunden digeriert, wobei eine grössere Menge anorganischer Salze, hauptsächlich KCl, ungelöst bleibt. Die Methanolösung wird wiederum im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit 50 ml Wasser aufgenommen. Diese Lösung wird filtriert und auf eine 3×50 cm Polyamidsäule (mit Äthanol und Wasser gewaschenes Grisamid der Firma Carl Roth, Karlsruhe) gegeben. Anschliessend wird mit Wasser eluiert und das Eluat in Fraktionen zu je 25 ml aufgefangen. Von jeder Fraktion wird ein Tropfen auf ein Papierchromatogramm aufgetragen und dieses mit Wasser entwickelt (vgl. Tabelle 1). Bei den angegebenen Mengenverhältnissen verlässt das Glykosid B die Säule mit nur geringer Überlappung nach A, während bei stärkerer Beladung die Überlappung so stark wird, dass sie eine Trennung praktisch unmöglich macht. Die A-haltigen Fraktionen enthalten noch grössere Mengen an fremden, teilweise auch fluoreszierenden Stoffen, während die B-haltigen Fraktionen schon weitgehend rein sind. Die A- bzw. B-haltigen Fraktionen werden vereinigt und in gleicher Weise weiter behandelt: nach dem Eindampfen im Vakuum wird in wenig 90-proz. Methanol gelöst und mit viel Äther vorsichtig gefällt. Sowie der Niederschlag schmierig zu werden droht, wird die Wasseraktivität durch Methanolzusatz herabgesetzt. Die Niederschläge werden rasch abgesaugt und, da sie sehr hygroskopisch sind, ohne nachzuwaschen in einem Vakuumexsikkator getrocknet. Ausbeuten: 110 mg (0,022%) rohes A und 180 mg (0,036%) rohes B.

### Glykosid A

Das rohe Glykosid A wird in wenig Wasser gelöst und mit basischem Bleiacetat bis zur vollständigen Fällung versetzt. Der orangefarbene Niederschlag wird abzentrifugiert, erst mit Wasser, dann mit Methanol gewaschen, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Bleisulfid wird abzentrifugiert und die klare Lösung im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird in 1 ml Wasser gelöst und auf 3 Viertelbogen säuregewaschenes Chromatographiepapier Macherey & Nagel Nr. 2214 aufgetragen. Nach der aufsteigenden Entwicklung mit Wasser werden die unter der UV-Lampe dunkel erscheinenden A-haltigen Zonen ausgeschnitten und mit 70-proz. Methanol eluiert. Das Eluat wird, zuletzt im Vakuumexsikkator, eingedampft. Der glasartige Rückstand kristallisiert beim Anreiben mit Methanol. Durchsichtige, ganz leicht bräunlichgelb gefärbte Kristalle, die sich beim Erhitzen ab 210° unter Dunkelfärbung zersetzen. Die Kristalle enthalten 3 Mol Kristallwasser, die sich auch bei 100° und 10<sup>-2</sup> Torr nicht entfernen lassen. (Ber. C 47,62 H 5,86 Aglykon 25,22 %. C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>O<sub>30</sub>.3 H<sub>2</sub>O (1135,0). Gef. C 47,30 H 5,78 Aglykon 25,22 %).

### Aglykon-(Kämpferol)-Bestimmung

Fünfzehn bis zwanzig mg Glykosid werden in einem Emichbecher mit 1 ml der unten beschriebenen Cellulaselösung und 1 ml 0,2 m Acetatpuffer (pH 4), sowie einigen Tropfen Toluol versetzt und eine Woche bei Raumtemperatur stehengelassen. Nun wird abgesaugt und 2 mal mit je 1 ml Wasser nachgewaschen. Das zurückbleibende Kämpferol wird bei 130° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

Im Filtrat lassen sich nach Entfernung der Na-Ionen mit Hilfe eines stark sauren Austauscherharzes papierchromatographisch Glucose und Rhamnose nachweisen (vgl. Tabelle 2).

### Herstellung der Cellulaselösung

Ein g käufliche, rohe Cellulase aus *Aspergillus niger* wird in 10 ml Wasser gelöst, filtriert, durch eine 2×20 cm Sephadex-G-25-Säule gegeben und das Eluat in Fraktionen von je 10 ml aufgefangen. Von jeder Fraktion werden je 0,1 ml mit 0,1 ml Acetatpuffer (pH 4) vermischt und je 1 mg Glykosid B darin aufgelöst. Diejenigen Fraktionen, die nach 24 Std. eine deutliche Abscheidung von Kämpferol zeigen, werden vereinigt und für die Hydrolyseversuche verwendet. Man erhält so 50 ml Cellulaselösung, die nur noch ca. 1 mg Feststoffe/ml enthält und mit Anilinhydrogenphthalat keine Reaktion auf Zucker gibt.

### Glykosid B (Kämpferol-3-rhamnoglucosid-7-glucosid)

Das rohe Glykosid B wird in wenig 90-proz. Dioxan gelöst, die filtrierte Lösung mit 50 ml Methanol verdünnt und mit 500 ml Äther gefällt. Sowie sich der Niederschlag abgesetzt hat, wird er rasch abgesaugt, mit wenig Äther gewaschen und sofort in einen Vakuumexsikkator gebracht. Die getrocknete Substanz wird mit wenig Methanol übergossen, worin sie sich zunächst auflöst, um sich alsbald in Form blassgelber Kristallchen wieder auszuscheiden. Die Kristalle sind unlöslich in Äther, sehr schwer löslich in abs. Methanol und Dioxan, gut löslich in Wasser, sowie wasserhaltigem Methanol und Dioxan. (Ber. C 50,00 H 5,59 Aglykon 36,11 %. C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>O<sub>20</sub>.2 H<sub>2</sub>O (792,7). Gef. C 50,23 H 5,47 Aglykon 36,52 %).

Das Aglykon wurde bestimmt wie bei Glykosid A. Im Filtrat des Kämpferols liessen sich nach Entfernung der Na-Ionen papierchromatographisch Glucose und Rhamnose nachweisen.

#### *Kämpferol-3-rhamnoglucosid (IV)*

200 mg Glykosid B und 100 mg Emulsin werden mit 10 ml 0,2 m Phosphatpuffer von pH 7 (bei niedrigerem pH ist die Spaltung nicht mehr einheitlich!) verrieben und nach Zusatz einiger Tropfen Toluol 40 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird der ganze Ansatz auf eine  $1,5 \times 30$  cm Polyamidsäule (siehe oben!) gegeben, die Zucker und der Puffer mit Wasser ausgewaschen und dann das Glykosid mit 50-proz. Äthanol eluiert. Beim Eindampfen scheidet sich das Glykosid als gelbes Pulver ab, das aus Wasser in hellgelben kleinen, zu kugeligen Aggregaten verwachsenen Nadelchen kristallisiert. Schmp. 185–190°. Zur Analyse wurde die Substanz bei 80° und 10<sup>-2</sup> Torr getrocknet.

(Ber. C 54,55 H 5,09 Aglykon 48,14%. C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub> (594,5). Gef. C 54,09 H 5,76 Aglykon 48,16%).

Im wässrigen Eluat der Polyamidsäule liess sich papierchromatographisch Glucose nachweisen. Bei der quantitativen Hydrolyse von IV mit n-HCl wurden im Filtrat des Kämpferols papierchromatographisch Glucose und Rhamnose nachgewiesen.

#### *Kämpferol-7-glucosid (II)*

(a) Aus Glykosid B. Zwanzig mg Glykosid B werden mit 2 ml n-HCl 3 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionsmischung ohne Rücksicht auf Abscheidungen quantitativ auf eine  $0,7 \times 3$  cm Polyamidsäule gegeben, zuerst die Zucker und die Säure mit Wasser, dann II mit 50-proz. Äthanol und schliesslich Kämpferol mit 96-proz. Äthanol eluiert. Beim Einengen der II-haltigen Fraktionen hinterbleibt II als hellgelbes Kristallpulver. Schmp. 225–227° (leichte Zersetzung).

(Ber. C 55,15 H 4,63%. C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>·1/2 H<sub>2</sub>O (457,4). Gef. C 54,74 H 4,77%).

(b) Aus Glykosid A. Es wurde wie vorstehend beschrieben verfahren, wobei aber zur Chromatographie eine 10 cm lange Säule verwendet wurde. So konnte in den ersten II-haltigen Fraktionen das etwas schneller wandernde Glykosid III papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Die Spaltung von II mit Emulsin wurde wie bei der Darstellung von IV beschrieben durchgeführt. Als Spaltstücke wurden papierchromatographisch Kämpferol und Glucose nachgewiesen.

#### *Methylierung von A, B und Robinin mit Diazomethan*

Je 20 mg A oder B oder Robinin werden in je 25 ml Aceton und 5 ml Wasser gelöst und mit je 1,5 mMol Diazomethan in 10 ml Äther versetzt. Nach 3 Stunden wird ein Tropfen Essigsäure zugefügt, auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 1 ml Acetatpuffer (pH 4), Cellulaselösung und einigen Tropfen Toluol versetzt. Man lässt 1 Woche bei Raumtemperatur stehen, dampft dann die Lösung zur Trockene ein und extrahiert den Rückstand mit Äthanol. Die Papierchromatogramme der aus A, B und Robinin durch Methylierung und Hydrolyse erhaltenen Reaktionsprodukte waren identisch; vgl. Tabelle 3.

*Alkalischmelze des Kämpferols*

Fünf mg Kämpferol werden in einem Reagensglas mit je 0,5 g NaOH und KOH über einer kleinen Flamme geschmolzen bis die auftretende Gelbfärbung gerade verschwunden ist. Nach dem Abkühlen wird in 20 ml Wasser aufgenommen, mit CO<sub>2</sub> gesättigt und 2 Tage mit Äther perforiert. Im Verdampfungsrückstand der Ätherlösung wird Phloroglucin papierchromatographisch und durch Farbreaktionen nachgewiesen ( $R_F = 0,65$  in tert. Butanol/Ameisensäure/Wasser 8 : 1 : 1; Kupplungsfarbe mit diazotierter Sulfanilsäure hellrot, mit Echtblausalz B blauviolett und mit Vanillin-Salzsäure rot). Der Rückstand nach der Extraktion des Phloroglucins wird mit verd. Schwefelsäure angesäuert und wiederum 2 Tage mit Äther perforiert. Im Rückstand der Ätherlösung lässt sich *p*-Hydroxybenzoësäure papierchromatographisch ( $R_F = 0,90$  in tert. Butanol/Ameisensäure/Wasser 8 : 1 : 1; Kupplungsfarbe mit diazotierter Sulfanilsäure orange und mit Echtblausalz B gelbbraun), sowie nach Mikrosublimation durch Schmelzpunkt (212–214°) und Mischschmelzpunkt nachweisen.