

# ÜBER SAPONINE DER SPIROSTANOLREIHE—X<sup>1</sup>

## ZUR KONSTITUTION DER SAMENSAPONINE VON *DIGITALIS LANATA* Ehrh.

R. TSCHESCHE und G. BALLE

Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

(Received 3 September 1963)

**Zusammenfassung**—Von den 5 Saponinen des mit Cholesterin fällbaren Anteils der Samenglykoside liess sich Lanatigonin I durch Verteilungschromatographie an Cellulosepulver fast rein isolieren, es ist ebenso wie Lanatigonin II mit dem Blattigonin nicht identisch. Lanatigonin I hat die Konstitution eines  $3\text{-O}[(\beta\text{-D-Glucopyranosyl(I)}\text{-(1}\rightarrow 3_{\text{Galakt. II}})\text{-}\beta\text{-D-galaktopyranosyl(II)}\text{-(1}\rightarrow 2_{\text{Gluc. III}})\text{-}\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow 3_{\text{Gluc. III}})\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl (III)}\text{-(1}\rightarrow 3_{\text{Galakt. IV}})\text{-}\beta\text{-D-galaktopyranosyl(IV)}\text{-(1}\rightarrow 3_{\text{Tigog.}})]\text{-}5\alpha,20\beta\text{-spirostanols-(3}\beta\text{)}$ .

TIGONIN wurde erstmals 1936 aus den Blättern von *Digitalis lanata* isoliert<sup>2</sup>; als seine Bausteine wurden Tigogenin und die Zucker 2 Moll. Glucose, 2 Moll. Galaktose und 1 Moll. Xylose ermittelt. Nach der Konstitutionsbestimmung des Digitonins aus den Samen von *Digitalis purpurea* L.<sup>1</sup> schien es wünschenswert, auch die Samensaponine von *D. lanata* Ehrh. zu untersuchen, um die Art ihrer Zuckerverknüpfung zu bestimmen. Schon früher wurde über den Nachweis von 5 verschiedenen Saponinen in den Samen berichtet,<sup>3</sup> von denen 2 Tigogenin, 2 Digalogenin und eines Gitogenin als Aglykon enthielten, wobei sowohl die  $25\alpha_F$ -wie die  $25\beta_F$ -Form nebeneinander vorkamen. Bei einer Neuuntersuchung stellte sich überraschend heraus, dass, wenn man die Saponine über eine Cholesterinfällung reinigte, ein Grossteil des oder der Gitogenin enthaltenden Glykoside ungefällt in der Mutterlauge verbleibt, während die anderen beiden Genine in dieser nach Hydrolyse kaum fesstellbar sind. Für die vorliegende Untersuchung wurde zunächst nur mit dem Cholesterin-fällbaren Anteil der Saponine gearbeitet.

Die Auf trennung der Saponine gelang durch Papierchromatographie allein in dem System Chloroform-Tetrahydrofuran-Pyridin 10 : 10 : 2, ges. m. Formamid (System A),<sup>4</sup> mit diesem liessen sich 5 verschiedene Glykoside nachweisen. Dabei ist das Trennergebnis am besten bei  $20\text{--}22^\circ$ , und es muss unter unbedingter Temperaturkonstanz und möglichst geringer Luftfeuchtigkeit gearbeitet werden. Auf diesem Wege war durch Verteilungschromatographie eine Trennung im präparativen

<sup>1</sup> R. Tschesche und G. Wulff, *Tetrahedron* **19**, 621 (1963).

<sup>2</sup> R. Tschesche, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **68**, 1090 (1935).

<sup>3</sup> R. Tschesche, G. Wulff und G. Balle, *Tetrahedron* **18**, 959 (1962).

<sup>4</sup> R. Tschesche und G. Wulff, *Chem. Ber.* **94**, 2019 (1961).

Maßstab auch an der Säule mittels Cellulosepulver möglich. Folgende Saponine wurden beobachtet:

Saponin	$R_{St}$ -Wert*	Aglykon	Bezeichnung
1	0·13	Gitogenin (+ polarere Nebengenine)	Lanagitonin†
2	0·29	Digalogenin	Lanadigalonin II
3	0·39	Digalogenin	Lanadigalonin I
4	0·80	Tigogenin	Lanatigonin II
5	1·00	Tigogenin	Lanatigonin I

\* System A,  $R_{St}$ -Werte bezogen auf Saponin 5.

† Sicher nicht einheitlich. Bei einer früher (siehe I.c. 3) vorgenommenen Zuordnung wurde Saponin 5 irrtümlicherweise als Lanagitonin angesehen.

Von diesen Saponinen konnte Lanatigonin I (Saponin 5) fast einheitlich und kristallisiert erhalten werden. Seine Hydrolyse lieferte nur Tigogenin und die fünf Zucker, die schon früher aus dem Lanatigonin der Blätter erhalten wurden. Letzteres ist sicher verschieden von dem der Lanata-Samen, da es bei der Papierchromatographie eine bedeutend kürzere Laufstrecke zeigte. Lanatigonin II kommt in den Samen nur in kleiner Menge vor, so dass es nicht rein erhalten werden konnte. Beide sind verschieden auch vom Tigonin der Samen von *D. purpurea*. Die Saponine 2 und 3 (mit Digalogenin als Aglykon) ließen sich nicht trennen, durch wiederholte Chromatographie gelang nur eine Anreicherung der Komponenten in der ersten und letzten Fraktion. Das Gemisch kristallisierte jedoch und enthielt die Bestandteile etwa im Verhältnis 1 : 1. Die beiden Formen  $25\alpha_F$  und  $25\beta_F$  des Digalogenins fanden sich auch in den angereicherten Fraktionen in dem früher gefundenen Verhältnis (ca. 1 : 3),<sup>3</sup> so dass der Unterschied der beiden Saponine nicht auf diese Isomerie zurückgeführt werden kann. Saponin I lag nur in sehr geringer Menge im Saponingemisch vor, es ist sicher nicht einheitlich, weil die Hydrolyse außer Gitogenin noch polarere Neben-aglykone ergab. Es wurde daher die Frage der Zuckerverknüpfung vorwiegend am Lanatigonin I untersucht.

In der Annahme, dass der Aufbau der Zuckerkette in allen Saponinen 1–5 oder zum mindesten in der Hauptmenge einheitlich sein könnte, wurde entsprechend der Untersuchung an den Samensaponinen von *D. purpurea*<sup>1</sup> zunächst mit dem Gesamt-saponin gearbeitet, zugleich um das wertvollere reine Lanatigonin I zu sparen, mit dem anschliessend die Ergebnisse nachgeprüft werden sollten. Die Permethylierung nach Kuhn und Mitarbeitern<sup>5</sup> und Hydrolyse ergab bei der Chromatographie an Kieselgel 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 4,6-Dimethyl-D-glucose und 2,3,4-Trimethyl-D-xylose, die anschliessend auch in ihren  $\alpha$ -Formen (pyranoid) kristallisiert wurden und mit authentischem Material identifiziert werden konnten. Ferner wurden papier- und dünnssichtchromatographisch in verschiedenen Lösungsmittelsystemen 2,4,6-Trimethyl-galaktose, 2,3,6-Trimethyl-galaktose und Spuren von 2,3,4,6-Tetramethyl-galaktose nachgewiesen, für die ebenfalls Vergleichsmaterial zur Verfügung stand.<sup>1</sup>

<sup>4</sup> R. Kuhn, H. Egge, R. Brossmer, A. Gauhe, P. Klesse, W. Lochinger, R. Röhm, H. Trischmann und D. Tschampel, *Angew. Chem.* **72**, 805 (1960).

## CHROMATOGRAPHIE DER METHYLZUCKER

	$R_G$ -Werte <sup>a</sup>		
	System C <sup>b</sup>	System D <sup>c</sup>	DC <sup>d</sup>
2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose	1.00	1.00	1.00
2,3,4-Trimethyl-D-xylose	0.92	0.88	1.11
2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose	0.75		0.81
3,4,6-Trimethyl-D-glucose	0.60	0.31	0.38
2,4,6-Trimethyl-D-glucose	0.48		0.30
2,3,6-Trimethyl-D-galaktose	0.42	0.31	0.59
2,4,6-Trimethyl-D-galaktose	0.42	0.20	0.45
2,3,4-Trimethyl-D-galaktose			0.25
3,4,6-Trimethyl-D-galaktose			0.23
4,6-Dimethyl-D-glucose	0.22	0.05	0.16

<sup>a</sup> Alle  $R_G$ -Werte sind auf 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose bezogen.<sup>b</sup> Syst. C: n-Butanol-Wasser-Tetrachlorkohlenstoff 4 : 4 : 3.<sup>c</sup> Syst. D: Benzol-Äthanol-Wasser-konz. NH<sub>4</sub>OH 200 : 47 : 14 : 1.<sup>d</sup> Dünnschichtchromatographie im System Benzol-Aceton 1 : 1, bzw. Benzol-Aceton 1 : 4 + 1% konz. NH<sub>4</sub>OH für Dimethylglucose.

## PAPIERCHROMATOGRAPHIE UND ELEKTROPHORESE DER ZUCKERSPALTSTÜCKE

	$R_G$ -Wert (Syst. B) <sup>a</sup>	$M_G$ -Wert <sup>b</sup>
Glucose	1.00	1.00
Galaktose	0.86	
Xylose	1.28	
Solabiose	0.60	0.53
Lycobiose	0.70	0.26
Lanatriose A	0.51	
Lanatriose B	0.42	
Lanatriose C	0.38	0.43
Lanatetraose	0.30	0.39
Digitotriose A	0.50	
Digitotriose B	0.45	
Digitotriose C	0.38	0.43
Digitotetraose	0.30	0.37

<sup>a</sup> Papierchromatographie im System B: Essigester-Pyridin-Wasser 2 : 1 : 2  $R_G$ -Werte bezogen auf D-Glucose.<sup>b</sup> Elektrophorese in Boratpuffer bei pH = 9.2 mit 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose als Nullpunkt.  $M_G$ -Werte bezogen auf D-Glucose.

Zum Vergleich sind auch die Digitotriosen und die Digitotetraose angeführt. (Die  $R_P$ -Werte wurden bei konstanter Temperatur (22°) und 25% Luftfeuchtigkeit noch einmal exakt bestimmt, wodurch sich gewisse Änderungen gegenüber früher<sup>1</sup> erklären.)

Zur Gewinnung der Oligosaccharide wurde wie bei der Spaltung der Saponine von *D. purpurea* die Hydrolyse des acetylierten Materials mit HBr-Eisessig verwendet. Die entacetylierten Saccharide wurden an Aktivkohle-Celite in Gruppen nach Biosen, Triosen und Tetraosen aufgeteilt, die mittels präparativer Papierchromatographie mit dem System B (Essigester-Pyridin-Wasser 2 : 1 : 2, obere Phase) getrennt wurden.<sup>1</sup>

An Biosen wurden Solabiose und Lycobiose isoliert und weiter durch Permethylierung und Spaltung die Bausteine in Form der entsprechenden Methylzucker identifiziert. Sehr geeignet für die Trennung ist auch die Papierelektrophorese der Boratkomplexe,<sup>6</sup> wobei die Solabiose auf Grund der doppelt so vielen *cis*-Diol-gruppen schneller als die Lycobiose wandert.

An Triosen wurden 3 nachgewiesen, die mit A, B und C bezeichnet wurden. Von ihnen ist die Triose C mit der Digitotriose C aus Digitonin identisch.<sup>1</sup> Sie gab bei der Permethylierung und Spaltung 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose und 3,4,6-Trimethyl-D-glucose; das Gemisch der Methylzucker wurde durch präparative Papierchromatographie im System C aufgetrennt und jede Fraktion für sich untersucht, so dass die Anwesenheit von 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose ausgeschlossen ist (siehe Tabelle). Reduktion der Triose mit  $\text{NaBH}_4$  zum Triit und anschließende Hydrolyse ergab Galaktose und Glucose. Es liegt also in der Lanatriose C die  $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 → 3)-D-galaktopyranosyl-(1 → 2)-D-glucopyranose vor. Die bisher unbekannte Lanatriose B entstand auch bei der Behandlung der nachfolgend beschriebenen Lanatetraose mit  $\beta$ -Glucosidase unter Abspaltung von Glucose. Lanatriose A wurde nicht weiter untersucht, da die gebildeten Mengen zu gering waren, sie muss ein Xylose-haltiges Bruchstück darstellen. Die erhaltene Tetraose wurde durch vorsichtige fraktionierte Fällung von einer Verunreinigung mit dem gleichen  $R_G$ -Wert weitgehend befreit, wobei diese sich im Niederschlag anreicherte. Die aus der Mutterlauge gewonnene Tetraose besaß den gleichen  $R_G$ -Wert wie Digitotetraose aus Digitonin und unterschied sich auch bei der Elektrophorese nur geringfügig von ihr. Nach der Permethylierung und Spaltung fanden sich 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 3,4,6-Trimethyl-D-glucose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose, sowie eine Spur von 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose. Die 3,4,6-Trimethylglucose konnte auch durch das elektrophoretische Verhalten eindeutig von ihren Isomeren unterschieden werden, da sie als einzige von ihnen unter Bildung eines Borsäurekomplexes im elektrischen Feld wanderte ( $M_Q$ -Wert 0,43). Die Totalhydrolyse der Tetraose ergab Glucose und Galaktose im Verhältnis 1 : 1. Nach Acetylierung, partieller Spaltung mit HBr-Eisessig und anschließender Entacetylierung entstanden etwas Lanatriose B und C, hauptsächlich aber Solabiose, Glucose und Galaktose und nur sehr wenig Lycobiose. Ihr Auftreten, sowie das von 2,3,6-Trimethylgalaktose unter den Methylierungs- und Spaltprodukten der Tetraose deutete darauf hin, dass diese noch nicht völlig einheitlich gewesen war. Bei der Untersuchung des Niederschlages bei der Reinigung der Tetraose liessen sich unter den genannten Bedingungen Lycobiose und 2,3,6-Trimethylgalaktose in beträchtlichen Mengen auffinden, wodurch diese Annahme unterstützt wird.

Für die Tetraose ergab sich damit ein alternierender Aufbau aus je 2 Molekülen Glucose und Galaktose. Es muss sich um die  $\beta$ -D-Glucopyranosyl(I)-(1 → 3)-D-galaktopyranosyl(II)-(1 → 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl(III)-(1 → 3)-D-galaktopyranose(IV) handeln. Sie unterscheidet sich also von der Digitotetraose in der Verknüpfung der Zucker III und IV, die in letzterer (1 → 4) ist. Die Tetraose soll weiterhin als Lanatetraose bezeichnet werden, bei der Spaltung kann sie nur Solabiose liefern. Die bei der Reinigung zum grössten Teil abgetrennte 2. Tetraose könnte die Digitotetraose aus Digitonin sein, die Solabiose und Lycobiose gleichzeitig liefert und bei der Methylierung und Spaltung 2,3,6- und 2,4,6-Trimethylgalaktose ergibt. Es bestehen aber auch die

<sup>6</sup> A. B. Foster, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol 12, 81 (1957).

beiden Möglichkeiten, dass entweder die Plätze von Solabiose und Lycobiose in der Digitotetraose vertauscht sind oder dass die Tetraose aus zwei Molekülen Lycobiose aufgebaut ist.

Nach diesen Feststellungen wurde nun die Untersuchung des reinen Lanatigonins I vorgenommen. Es gab bei der Methylierung und Spaltung 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 4,6-Dimethyl-D-glucose, 2,3,4-Trimethyl-D-xylose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose und ein wenig von 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose. Beim Abbau des Acetylierungsproduktes mit HBr-Eisessig und Desacetylierung entstanden Glucose, Galaktose, Xylose, Solabiose, Spuren von Lycobiose (von Spuren Lanatigonin II hervorrangend), wenig Lanatriosen und eine Tetraose, bei der es sich um die neue Lanatetraose handeln muss. Entsprechend den Überlegungen beim Digitonin<sup>1</sup> kann die Xylose nur in der 3-Stellung der Glucose III angreifen. Danach besitzt Lanatigonin I die nachfolgende Konstitution (Formel I), wobei die  $\beta$ -glykosidische Bindung zwischen den Zuckern I und II, sowie III und IV durch die Kenntnis des Aufbaus der Solabiose und durch die Spaltung mit  $\beta$ -Glucosidase gesichert ist. Unklar bleibt die Konfiguration der Bindungen zwischen den Zuckern II und III und D-Xylose und III. In Analogie zum Digitonin wird auch in diesen Fällen  $\beta$ -glykosidische Bindung vermutet, ebenso zwischen Zuckerkette und Genin. Lanatigonin II ist mit Lanatigonin I wahrscheinlich isomer; sein Zuckerteil besteht aus einer Tetraose, die nach einer der oben diskutierten Möglichkeiten gebaut ist und Xylose, welche auch hier in 3-Stellung einer Glucose angeknüpft ist.

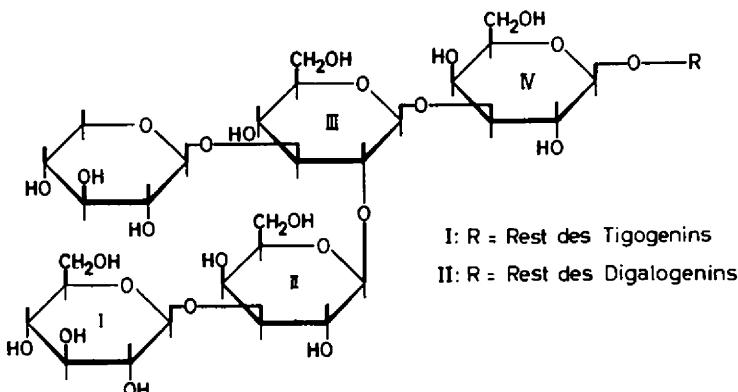


Abb. 1

Die Untersuchung des kristallisierten Gemisches von Lanadigalonin I und II führte zu folgenden Ergebnissen: Es wurden die gleichen Methylzucker wie beim Lanatigonin I erhalten, jedoch wesentlich mehr 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose, bzw. Lycobiose. Die Mengen an Lycobiose und Solabiose verhielten sich etwa wie 1 : 3 bis 1 : 4, ein gleiches Verhältnis wurde auch für die 2,3,6-Trimethyl- und 2,4,6-Trimethylgalaktose gefunden. Eines der beiden Lanadigalonine, und zwar I, sollte daher im Zuckerteil dem Lanatigonin I analog gebaut sein, das andere II könnte dem Lanatigonin II entsprechen. Aus dem chromatographischen Verhalten darf man schliessen (unter der wahrscheinlichen Annahme, dass der Unterschied zwischen Tigogenin und Digalogenin—letzteres trägt an C-15 eine zusätzliche

OH-Gruppe—nicht zur Umkehrung der Laufstreckenverhältnisse bei den Saponinen führt), dass Lanadigalonin I Formel II besitzt.

Während bei den Saponinen aus Purpureasamen Glucose III und Galaktose IV ( $1 \rightarrow 4$ )-verknüpft sind, liegt bei einem Teil der Samensaponine von *D. lanata* an dieser Stelle ( $1 \rightarrow 3$ )-Verknüpfung vor. Der andere Teil weist eine, möglicherweise zwei ( $1 \rightarrow 4$ )-Verknüpfungen zwischen Glucose und Galaktose auf; wären diese Saponine den Purpureasaponinen analog konstituiert, müßten sich beim chromatographischen Vergleich der beiden Saponingemische identische Komponenten nachweisen lassen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die ( $1 \rightarrow 4$ )-Verknüpfung muß sich hier also zwischen I und II oder zwischen I und II sowie III und IV finden. Die Galaktose II und die Glucose III sind wie bei den Purpureasaponinen durchweg ( $1 \rightarrow 2$ )-verknüpft.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden nach Kofler in der Anordnung von C. Weygand bestimmt, die IR-Spektren in KBr oder Chloroform mit dem Modell 221 von Perkin-Elmer (mit Gitter-prismen-Austauscheinheit) aufgenommen. Die C,H-Bestimmungen führte Herr Dr. Ing. A. Schoeller, Kronach, aus.

Folgende Abkürzungen werden verwendet: Chlf. = Chloroform; An. = Aceton; MeOH = Methanol; EtOH = Äthanol; BuOH = Butanol; Bzl. = Benzol; THF = Tetrahydrofuran; Pyr. = Pyridin; DMF = Dimethylformamid; konz. = konzentriert; Lsg. = Lösung.

Zur Papierchromatographie diente das Papier 2043 bMgl (Schleicher & Schüll). Chromatographiert wurde nach der absteigenden Methode in folgenden Lösungsmittelsystemen:

System A: THF-Chlf.-Pyr. 10 : 10 : 2, formamidgesättigt, auf formamidimprägniertem Papier (für Saponine).<sup>4</sup>

System B: Essigester-Pyr.-Wasser 2 : 1 : 2, obere Phase (für Mono- und Oligosaccharide).<sup>5</sup>

System C: n-BuOH-Wasser-CCl<sub>4</sub> 4 : 4 : 3, schwere Phase (für Methylzucker).<sup>1</sup>

System D: Bzl.-EtOH-Wasser-konz. NH<sub>4</sub>OH 200 : 47 : 14 : 1 (für Methylzucker, gute Trennung der Trimethylgalaktosen).<sup>1,6</sup>

Als Anfärbereagenzien dienten Anilin phthalat nach Partridge<sup>8</sup> für Zucker und Methylzucker sowie eine 20-proz. Lsg. von SbCl<sub>3</sub> in Chlf. für Saponine.

Präparative Trennungen wurden an Bögen des Papiers 2043 bMgl von 45 cm Breite und 50 cm Länge ausgeführt. In den Systemen B, C und D konnten 30 mg pro Bogen aufgetragen werden. Die Lage der Substanzen wurde durch Ausschneiden und Anfärben von Leitstreifen ermittelt.

Die Dünnschichtchromatographie wurde nach I.c. 4 ausgeführt. Als Trägermaterial diente Kieselgel G (Merck), für präparative Trennungen Kieselgel H (Merck). Als Laufmittel bewährten sich Chlf.-An. 4 : 1 für die Genine, Chlf.-Essigester 99 : 1 für die Geninacetate, Bzl.-An. 1 : 1 für die Methylzucker und Bzl.-An. 1 : 4 + 1% konz. NH<sub>4</sub>OH für die Dimethylglucose. Angefärbt wurde mit Anilinphthalat (Methylzucker) und mit Chlorsulfosäure-Eisessig 1 : 3 (Genine und Geninacetate). Bei der präparativen Dünnschichtchromatographie ließen sich die Methylzucker mit Hilfe eines Fluoreszenzindikators<sup>10</sup> sichtbar machen, der dem Adsorbens vor dem Ausstreichen zugesetzt wurde, Sie erschienen unter der Analysenquarzlampe als schwach fluoreszierende Zonen.

Zur Papierelektrophorese vgl. I.c. 6. Zur Ausführung diente ein "Pherograph-Original-Frankfurt" nach Wieland-Pfleiderer, als Pufferlsg. 0.2 M Natriumborat vom pH 9.2. Gearbeitet wurde bei 1500 V und  $-5^\circ$ , wobei die Glucose in 2 Stdn. etwa 20 cm weit wanderte. Die M<sub>G</sub>-Werte wurden auf D-Glucose bezogen, als Nulllinie wurde 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose mit aufgetragen.

#### Isolierung der Saponine

5 kg gemahlene Samen von *D. lanata* Ehrh. wurden in einem heizbaren Perkolator mit 150 l MeOH-Wasser 2 : 1 bei  $35^\circ$  extrahiert. Die bis zur breiigen Konsistenz eingeengte Lsg. wurde

<sup>7</sup> M. A. Jermin und F. A. Isherwood, *Biochem. J.* **44**, 402 (1949).

<sup>8</sup> H. C. Srivastava und G. Adams, *Canad. J. Chem.* **40**, 1415 (1962).

<sup>9</sup> S. M. Partridge, *Nature. Lond.* **164**, 443 (1948).

<sup>10</sup> R. Tschesche, G. Biernoth und G. Wulff, *J. Chromatogr.* im Druck; siehe auch H. Halpaap, *Chem. Ing. Techn.* **35**, 488 (1963).

anteilweise durch Schütteln mit Petroläther entfettet, zur Trockne eingedampft und der Rückstand mehrmals mit heißem 96-proz. EtOH ausgezogen (insgesamt 18 l). In Vorversuchen unter Kontrolle durch Papierchromatographie zeigten die Saponine selbst bei längerem Kochen in EtOH keine Veränderung. Aus der durch Filtration nach 24 Stdn. geklärten und auf 5 l eingeengten heißen alkoholischen Lsg. fällte eine heiss gesättigte Lsg. von 40 g Cholesterin in 96-proz. EtOH die Saponine als Cholesterin-Additionsverbindungen aus. Das Saponincholesterid wurde durch Lösen in warmem Pyr. und Zusatz von viel Äther<sup>11</sup> wieder aufgespalten. Wiederholung der Cholesterinfällung lieferte 110 g der Additionsverbindung. Diese gaben bei der Cholesteridspaltung 76 g ätherunlöslichen Anteil, der fünfmal mit 96-proz. EtOH (insgesamt 20 l) kurz aufgekocht wurde. Aus der Lsg. schied sich beim Stehen über Nacht ein saponinhaltiges Pulver ab, die Lsg. lieferte nach der Filtration beim Eindampfen 61.5 g Saponin, der EtOH-unlösliche Rückstand wog 5.5 g. Das Rohsaponin liess sich unter Verlusten aus 96-proz. EtOH kristallisieren; hierbei fielen 35.6 g Saponin in Form von zu Drusen vereinigten farblosen Nadelchen an. Ein etwas unreineres Produkt konnte durch Chromatographie der Mutterlauge an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (desaktiviert) mit  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  1 : 1 gewonnen werden.

350 g Zellulosepulver (Whatman) wurden in An.-Formamid 7 : 3 mit dem Ultraturrax gut homogenisiert und in eine Säule von 5 cm Durchmesser eingeschlämmt, mit weiteren 800 ccm Formamid gewaschen und anschliessend mit der mobilen Phase des Systems A äquilibriert. Das Verdrängungsvolumen  $V_0$  betrug 720 ccm. 3 g Saponingemisch wurden, in 50 ccm mobiler Phase gelöst, auf die Säule aufgebracht und mit insgesamt 21.5 l mobiler Phase eluiert. Alle 2 Stdn. fiel eine Fraktion von 150 ccm an. Die flüchtigen Lösungsmittel wurden im Wasserstrahlvakuum, das Formamid an der Ölspitze (Badtemperatur 60–65°) abgedampft. Die folgende Tabelle gibt den Verlauf der Säulentreinigung wieder:

Fraktion	Menge (mg)	Inhalt
1–6	293	Unpolare Bestandteile
7–27	164	Unpolare Bestandteile + Spuren Sap. 5
28–43	129	Unpolare Bestandteile + Saponin 5
44–57	239	Saponin 5
58–63	200	Saponin 5 + wenig 4
64–69	186	Saponin 5 + 4 – wenig Saponin 3 + 2
70–84	219	Saponin 5 – 2
85–86	26	wenig Saponin 4 – Saponin 3 + 2
87–107	907	Saponin 3 + 2 (etwa 1 : 1)
108–114	676	Saponin 3 + 2 – wenig Saponin 1
115–118	208	Saponin 3 – 1
119–123	62	wenig Saponin 3 + 2 – Saponin 1
124–143	140	Saponin 1

*Lanatigonin I.* Die Fraktionen 44–57 lieferten nach mehreren Kristallisationen aus 96-proz. EtOH bei sehr langsamem Abkühlen der Lsg. 80 mg papierchromatographisch einheitliches (System A) Lanatigonin I (Saponin 5) in farblosen, zu Drusen vereinigten Nadelchen vom Fp. 275–285° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25} +42.5^\circ$  ( $c = 1.54$ , Pyr.); die Zuckerbestimmung ergab Glucose, Galaktose und Xylose im Verhältnis 2 : 2.12 : 0.96. Als Aglykon wurde Tigogenin nachgewiesen.  $\text{C}_{58}\text{H}_{92}\text{O}_{27} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1215.4): Ber. C, 55.34; H, 7.80; Gef. C, 55.54; H, 7.82.

*Lanadigalonin I – II.* Aus den Fraktionen 87–107 liess sich ein Gemisch von Lanadigalonin I und II (Saponin 3 und 2) kristallisieren (96-proz. EtOH), ohne dass dabei eine Änderung des Mengenverhältnisses eintrat. Die Zuckerbestimmung zeigte Glucose, Galaktose und Xylose im Verhältnis 2 : 1.96 : 1.06 an. Als Aglykon war nur Digalogenin nachzuweisen.  $\text{C}_{66}\text{H}_{98}\text{O}_{48} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1231.4): Ber. C, 54.62; H, 7.69; Gef. C, 54.69; H, 7.29.

*Lanatigonin II.* Die Fraktionen 58–63 enthielten papierchromatographisch deutlich nachweisbares Saponin 4; im Hydrolysat wurde nur Tigogenin nachgewiesen. *Lanagitonin:* Eine Probe der Fraktionen 124–143 gab bei der Hydrolyse Gitogenin und geringe Mengen polarerer Genine. 500 mg Lanadigalonin gemisch wurden an einer wie oben beschrieben hergestellten Säule von 100 g Zellulose im System A chromatographiert. In den ersten Substanz-enthaltenden Fraktionen war

<sup>11</sup> R. Schönheimer und H. Dam, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 215, 59 (1933).

Lanadigalonin I deutlich angereichert, in den letzten Fraktionen Lanadigalonin II. Proben dieser Fraktionen wurden hydrolysiert, die Genine mit Essigsäureanhydrid in Pyr. (12 Stdn. bei Zimmer-temperatur) acetyliert und die Produkte nach der Aufarbeitung dünnsschichtchromatographisch im System Chlf-Essigester 99 : 1 untersucht. In beiden Fällen überwog stark das  $25\beta$ -Digalogenin-acetat.

Zur Hydrolyse wurden die Saponine in EtOH-Wasser 1 : 1, 4 n an HCl, 2 Stdn. auf 80° erhitzt, wobei man die Lösung mit etwas Bzl. überschichtete.<sup>13</sup> Die Genine wurden durch Ausschütteln mit Chlf. und Neutralwaschen der Chlf.-Phase mit Wasser erhalten.

Zur quantitativen Zuckerbestimmung wurden jeweils 5 mg Saponin in Dioxan-Wasser 1 : 1 mit 3 n HCl 3 Stdn. auf 80° erhitzt. Nach dem Abdampfen des Dioxans befreite man die wässrige Lsg. durch Schütteln mit n-BuOH von Genin und unverestertem Anteil und neutralisierte sie mit Dowex 3. Als Standard diente ein den gleichen Bedingungen unterworfenes Gemisch von Glucose, Galaktose und Xylose im Molverhältnis 2 : 2 : 1. Test- und Standardgemisch wurden als 1-proz. Lsgn. im System B chromatographiert. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von Fischer und Doerfel<sup>12</sup> durch Photometrieren des mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid gebildeten Farbstoffs bei 482 m $\mu$  und Umrechnen der Extinktionen auf die Molverhältnisse der Zucker untereinander. Die Genine wurden in der BuOH-Phase nach kurzer Nachhydrolyse dünnsschichtchromatographisch im System Chlf-An. 4 : 1 nachgewiesen.

#### *Methylierung der Saponine*

Die Methylierungen wurden mit CH<sub>3</sub>J und BaO-Ba(OH)<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O in DMF nach einer Vorschrift von R. Kuhn et al.<sup>5</sup> durchgeführt. Als Lösungsmittel bewährte sich DMF "Uvasol" (Merck), das BaO (Degussa) war gepulvert und peroxydfrei.

Je 20 mg Saponingemisch, Lanatigonin I oder Lanadigalonin I + II wurden in je 0·4 ccm DMF gelöst und mit je 0·1 ccm CH<sub>3</sub>J, 90 mg BaO und 3 mg Ba(OH)<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O 4 Stdn. bei 40° und 20 Stdn. bei 20° unter gutem Feuchtigkeitsausschluss gerührt. Die Reaktionsgemische wurden in je 20 ccm Chlf. aufgenommen, die filtrierten Lsgn. durch mehrfaches Waschen mit Wasser von DMF befreit und eingedampft. Im IR-Spektrum zeigten die gut getrockneten Produkte noch OH-Banden, weshalb der Prozess wiederholt werden musste. Die so erhaltenen hydroxyoxylsrfreien Permethylsaponine kochte man in je 10 ccm 5-proz. absolutmethanolischer HCl 6 Stdn. lang am Rückfluss, fällte die Genine durch Zusatz von je 10 ccm Wasser und Abdampfen des MeOH aus und filtrierte sie ab. Die Filtrate machte man 2 n an HCl, erhitzte sie 2 Stdn. im Wasserbad auf 100° und neutralisierte anschliessend mit Dowex 3. Die so gewonnenen Methylzuckergemische wurden papier-(Systeme C und D) und dünnsschichtchromatographisch untersucht. Lanatigonin I lieferte 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 2,3,4-Trimethyl-D-xylose, 4,6-Dimethyl-D-glucose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose und Spuren 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose. Aus Lanadigalonin I + II waren die gleichen Verbindungen entstanden, jedoch liess sich wesentlich mehr 2,3,6-Trimethylgalaktose nachweisen. Das Verhältnis 2,3,6- zu 2,4,6-Trimethylgalaktose war etwa 1 : 3 bis 1 : 4. Das Gemisch der Samensaponine gab ausser den bereits nachgewiesenen Methylzuckern noch geringe Mengen 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose. (Zur Chromatographie der Methylzucker siehe Tabelle 1).

Zur Gewinnung von Methylzuckern in grösserem Massstab wurden 5 g Lanatasaponin in 40 ccm DMF mit 8 g BaO, 350 mg Ba(OH)<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O und 10 ccm CH<sub>3</sub>J in der oben beschriebenen Weise methyliert. Nach der Aufarbeitung wurde die Methylierung mit der halben Menge Reagentien wiederholt. Es resultierten 4·7 g eines hellgelben Schaumes, dessen IR-Spektrum keine OH-Bande enthielt. Sechsständiges Kochen in 200 ccm methanolischer HCl am Rückfluss spaltete das Permethylsaponin; die Genine wurden durch Zusatz von 100 ccm Wasser und Abdampfen des MeOH ausgefällt, abfiltriert und gut mit Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwässer wurden auf 100 ccm eingeeengt, 2 n an HCl gemacht und 2 Stdn. im Wasserbad auf 100° erhitzt. Zur Neutralisation diente feingepulvertes PbCO<sub>3</sub>. Nach Abfiltrieren und Waschen des Niederschlags schüttelte man die neutrale Lsg. fünfmal mit Chlf. aus. In der Chlf.-Phase fanden sich 627 mg eines hellgelben Sirups, der hauptsächlich unpolare Methylzucker enthielt (Gemisch I). Aus der wässrigen Phase fällte H<sub>2</sub>S die Hauptmenge der Pb-Ionen aus, den Rest entfernte Dowex 50 (H<sup>+</sup>). Nach Neutralisieren an einer Säule von Dowex 3 (OH<sup>-</sup>) lieferte die Lsg. 1·74 g polare Methylzucker (Gemisch II).

Beide Methylzuckergemische wurden nacheinander an einer Säule von 400 g Kieselgel (Korngrösse

<sup>12</sup> F. G. Fischer und H. Doerfel, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 297, 164 (1954).

<sup>13</sup> E. S. Rothmann, M. E. Wall und H. A. Walens, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5791 (1952).

71–85  $\mu$ ) chromatographiert. Aus Gemisch I eluierte Bzl.–An. 7 : 1 150 mg Trimethylxylose, 286 mg Tetramethylglucose und 28 mg Tetramethylgalaktose sowie Mischfraktionen.

**2,3,4,6-Tetramethyl- $\alpha$ -D-glucose.** Die Substanz wurde über eine präparative Dünnschichtchromatographie im System Bzl.–An. 4 : 1 (Mehrachsentwicklung) von geringen Mengen Trimethylxylose befreit und kristallisierte aus Petroläther 40–60° in farblosen Nadeln vom Fp. 90–93°,  $[\alpha]_D^{25,4} + 92.7^\circ$  (10 Min.)  $\rightarrow -77.7^\circ$  (23 Stdn.) ( $c = 1.0$ ; Wasser). Lit.<sup>14</sup>: Fp. 96°,  $[\alpha]_D + 92^\circ \rightarrow +84^\circ$  (Wasser). Unsere Substanz gab im Gemisch mit aus D-Glucose dargestellter 2,3,4,6-Tetramethyl- $\alpha$ -D-glucose keine Schmelzpunktsdepression; die IR-Spektren der beiden Substanzen stimmten in allen Einzelheiten überein.  $C_{10}H_{20}O_6$  (236.3) Ber. C, 50.83; H, 8.53; Gef. C, 50.99; H, 8.31.

**2,3,4-Trimethyl- $\alpha$ -D-xylose.** Die Trimethylxylose kristallisierte aus Äther–Petroläther 40–60° beim Eindunsten in farblosen, derben Prismen vom Fp. 87–90° (Sintern bei 83°),  $[\alpha]_D^{15,8} + 18.3^\circ$  (Endwert), ( $c = 1.0$ ; Wasser). Lit.<sup>15</sup>: Fp. 91–92°,  $[\alpha]_D + 18^\circ$  (Wasser). Die Substanz war identisch mit synthetischer 2,3,4-Trimethyl- $\alpha$ -D-xylose (aus D-Xylose).  $C_8H_{16}O_5$  (192.2): Ber. C, 49.99; H, 8.39; Gef. C, 50.49; H, 8.37.

Aus Gemisch II eluierte Bzl.–An. 7 : 1 32 mg Trimethylxylose, 40 mg Tetramethylglucose und 15 mg Tetramethylgalaktose sowie Mischfraktionen, mit Bzl.–An. 85 : 15 kamen 22 mg 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose und 368 mg 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose, die mit etwas 2,3,6-Isomerem verunreinigt war, Bzl.–An. 7 : 3 eluierte schliesslich 189 mg Dimethylglucose.

**4,6-Dimethyl- $\alpha$ -D-glucose.** Die Dimethylglucose kristallisierte aus Essigester in langen, farblosen Nadeln vom Fp. 160–161°, (Sintern bei 155°),  $[\alpha]_D^{15} - 99.2^\circ$  (18 Min.)  $\rightarrow + 62.3^\circ$  (23 Stdn.) ( $c = 2.0$ , Wasser). Lit.<sup>16</sup>: Fp. 163–164°,  $[\alpha]_D + 118^\circ \rightarrow 67.5^\circ$  (Wasser). Ein Gemisch mit authentischer 4,6-Dimethyl- $\alpha$ -D-glucose zeigte keine Schmelzpunktterniedrigung. Die IR-Spektren der beiden Substanzen waren in allen Einzelheiten identisch.  $C_8H_{16}O_6$  (208.2): Ber. C, 46.15; H, 7.75; Gef. C, 46.38; H, 7.92.

Dünnschicht- und papierchromatographisch wurden außerdem 2,3,4,6-Tetramethyl-D-galaktose, 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose und 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose mit authentischen Vergleichssubstanzen identifiziert (siehe Tabelle 1). Letztere konnte durch präparative Dünnschicht- und Papierchromatographie weitgehend gereinigt, jedoch nicht kristallisiert werden. Sie erwies sich als rechtsdrehend.

#### HBr-Eisessig-Abbau der peracetylierten Saponine.<sup>1,17</sup>

Je 20 mg Lanatasaponin, Lanatigonin I oder Lanadigalogenin I + II wurden in je 2 ccm Pyr. mit je 2 ccm Essigsäureanhydrid 12 Stdn. auf 40° erwärmt. Die durch Eingießen in Wasser und Ausschütteln mit Chlf. erhaltenen Acetate löste man in je 0.5 ccm Chlf. und setzte den Lsgn. je 0.5 ccm HBr-Eisessig (60 g HBr auf 100 g Eisessig) zu. Nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurden die Ansätze mit je 50 ccm Chlf. verdünnt, mit Wasser gut säurefrei gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und eingedampft. Die Acetylgruppen spaltete man durch Behandeln mit je 10 ccm methanolischem  $NH_3$  (absolutes MeOH bei 0° mit  $NH_3$  gesättigt) ab, dampfte die Lsgn. bei 15° im Vakuum ein und verteilte den Rückstand zwischen Wasser und n-BuOH. Die wässrige Phase enthielt die Mono- und Oligosaccharide sowie Acetamid, in der BuOH-Phase fanden sich die Genine und unverseifte Anteile. Die Zuckergemische wurden im System B chromatographisch untersucht. Lanatigonin I und Lanadigalolon I + II lieferten D-Glucose, D-Galaktose, D-Xylose, Solabiose, Lycobiose, Lanatriose A, B und C und Lanatetraose. Die Lycobiose entstand aus Lanatigonin I nur spurenweise, im Lanadigaloningemisch verhielten sich Lyc- und Solabiose wie 1 : 3 bis 1 : 4. Die gleichen Produkte wurden auch aus dem Gesamtgemisch der Saponine erhalten. Um eine gegenseitige Beeinflussung der Zucker bei der Chromatographie auszuschliessen, trennte man die verschiedenen Zuckergemische zunächst präparativ an Streifen des Papiers 2043 bMgl. auf und verglich die in den ausgeschnittenen Zonen lokalisierten Substanzen mit authentischem Material bzw. mit den später präparativ dargestellten Oligosacchariden. (Zur Chromatographie und Elektrophorese der Zucker siehe Tabelle 2).

Zur Herstellung grösserer Mengen der Oligosaccharide wurden 20 g Lanatasaponin in der bereits beschriebenen Weise acetyliert und 29.06 g Peracetylsaponin erhalten. Dieses lieferte bei der Spaltung mit HBr-Eisessig und Entacetylierung mit  $NH_3$ /MeOH 15.6 g Monosen, Oligosaccharide und

<sup>14</sup> J. C. Irvine und J. W. H. Oldham, *J. Chem. Soc.* **119**, 1744 (1921).

<sup>15</sup> R. A. Laidlaw und E. G. V. Percival, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 7, 29 (1952).

<sup>16</sup> R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, *Chem. Ber.* **90**, 203 (1957).

<sup>17</sup> R. Kuhn, I. Löw und H. Trischmann, *Chem. Ber.* **88**, 1492 (1955).

Acetamid sowie 11.2 g BuOH-löslichen Anteil. Das Zucker-Acetamid-Gemisch wurde in 200 ccm Wasser gelöst, die Lsg. kurz mit 30 g Aktivkohle aufgekocht und abfiltriert. Das Filtrat enthielt Acetamid, die Hauptmenge der Monosen und etwas Biosen. Die Kohle wurde fünfmal mit je 100 ccm 40-proz. EtOH aufgekocht und abgesaugt. Beim Eindampfen des Filtrats hinterblieben 5.04 g eines gelben Sirups, der in der Hauptsache die Oligosaccharide enthielt. Dieses Gemisch wurde auf eine Säule von 100 g Celite und 50 g Aktivkohle (nach Whistler und Durso<sup>18</sup>) aufgebracht und zunächst mit Wasser, dann mit wässrigem EtOH (unvergällt) steigender Konzentration eluiert. Wasser eluierte 1.32 g Monosen und Biosen, 2-proz. EtOH 1.24 g Biosen, 6-proz. EtOH 420 mg Triosen, mit 15-proz. EtOH kamen 325 mg eines Gemischs der Triosen mit der Tetraose, mit 25-proz. EtOH schließlich 300 mg Tetraose.

*Biosen.* Die beiden Biosen wurden durch präparative Papierchromatographie im System B voneinander getrennt und mit authentischen Substanzen chromatographisch und elektrophoretisch identifiziert. Bei der Methylierung und Spaltung (wie oben beschrieben) lieferten beide 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, Solabiose<sup>17</sup> ( $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1-3)-D-galaktopyranose) ausserdem 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose, während Lycobiose<sup>18</sup> ( $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1-4)-D-galaktopyranose) 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose gab.

*Lanatriose C.* Aus dem Gemisch der Triosen liess sich an Papierbögen im System B Lanatriose C rein abtrennen. 5 mg wurden wie oben methyliert und gespalten. Das Methylzuckergemisch trennte man an einem 8 cm Breiten Papierstreifen im System C auf; in den aus den Substanzzonen eluierten Fraktionen konnten dünnenschicht- und papierchromatographisch 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose und 3,4,6-Trimethyl-D-glucose identifiziert werden. Die 3,4,6-Trimethyl-D-glucose wurde auch an ihrer Wanderung bei der Elektrophorese ( $M_6$ -Wert 0.43) erkannt.

10 mg Triose wurden in 1 ccm Wasser mit 5 mg NaBH<sub>4</sub> reduziert, das überschüssige Reagens mit einem Tropfen Eisessig zerstört und die Lsg. mit Dowex 50 (H<sup>+</sup>) und Dowex 2 (OH<sup>-</sup>) entsalzt. Zweistündige Hydrolyse mit 2 n HCl lieferte Glucose und Galaktose.

*Lanatetraose.* Die Tetraose war papierchromatographisch (System B), dünnenschichtchromatographisch (n-BuOH-Eisessig-Wasser 4 : 5 : 1 an mit Borsäure imprägniertem Kieselgel, zweimal entwickelt<sup>19</sup>) sowie im Elektropherogramm einheitlich. Sie wurde in MeOH-Wasser gelöst und durch vorsichtige Zugabe von n-BuOH in der Hitze wiederholt ein kleiner Anteil ausgefällt. Sowohl vom Niederschlag als auch von dem in Lsg. gebliebenen Anteil wurden je 5 mg methyliert. Beide Proben lieferten 2,3,4,6-Tetramethyl-D-glucose, 3,4,6-Trimethyl-D-glucose, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose und 2,3,6-Trimethyl-D-galaktose. Letztere trat im Methylierungsprodukt des Niederschlags in beträchtlichen Mengen auf, die Mutterlauge der Fällung lieferte sie dagegen nur in Spuren. Die Methylzuckergemische waren wieder im System C präparativ aufgetrennt worden. Auf diese Weise konnten die beiden Trimethylgalaktosen und die Trimethylglucose eindeutig voneinander getrennt werden (siehe Tabelle I).

Je 10 mg von beiden Tetraosepräparaten wurden wie bereits beschrieben mit HBr-Eisessig gespalten. Nach der Aufarbeitung fanden sich neben geringen Mengen der Triosen Solabiose, Lycobiose, Glucose und Galaktose. Aus dem Mutterlaugenpräparat entstanden Spuren, aus dem Fällungspräparat grössere Mengen Lycobiose. Erstes stellt also die weitgehend gereinigte Lanatetraose dar.

5 mg Tetraose wurden in 2 n HCl 2 Stdn. auf 80° erhitzt. Nach der Neutralisation mit Dowex 3 liessen sich Glucose und Galaktose nachweisen. Die quantitative Bestimmung (nach I.c. 12) ergab das Molverhältnis Glucose: Galaktose = 1 : 1.05. 5 mg Tetraose wurden zusammen mit 3 mg  $\beta$ -Glucosidase in 5 ccm Wasser gelöst. Die Lsg. blieb, mit Toluol überschichtet, 8 Tage im Brutschrank bei 35°. Nach Ausfällen des Enzyms aus der wässrigen Phase mit 20 ccm An. und Eindampfen des Filtrats zeigten sich im Papierchromatogramm nicht umgesetzte Tetraose, Lanatriose B und D-Glucose.

Wir danken der Firma Promonta GmbH, Hamburg, für die Überlassung einer grösseren Menge Samen von *D. lanata*, der Firma P. Beiersdorf & Co. für einige Saponinproben sowohl aus *D. purpurea* wie aus *D. lanata* und dem Fonds der Chemie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Für die Überlassung von Vergleichssubstanzen sind wir den Herren Prof. R. Kuhn (Heidelberg), Prof. D. J. Bell (Edinburgh), Dr. E. G. V. Percival (Edinburgh) und Dr. H. G. Fletcher (Bethesda) zu großem Dank verpflichtet.

<sup>18</sup> R. L. Whistler und D. F. Durso, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 677 (1950).

<sup>19</sup> V. Prey, H. Berbalk und M. Kausz, *Microchim. Acta* 968 (1961); 449 (1962).