

1-Skatyl-cyclohexanon-(2)-carbonsäure-(1)-benzylester (XV): Die Verbindung wird analog der Herstellung des Ketons (VII) aus 3-Piperidinomethyl-indol und Cyclohexanon-(2)-carbonsäure-(1)-benzylester gewonnen. Die Verbindung hat nach dem Umkristallisieren aus Alkohol einen Schmp. von 130–131°.

$C_{23}H_{23}O_3N$ (361.4) Ber. C 76.43 H 6.41 N 3.87 Gef. C 76.51 H 6.45 N 4.02

1-Skatyl-cyclohexanon-(2) (XVI): Die Verbindung wird durch Hydrierung des Ketoesters XV in Eisessig mit Palladium auf Kohle gewonnen. Sie kristallisiert nicht, bildet jedoch ein krist. Semicarbazone vom Schmp. 187°.

Cyclisierung von Skatylcyclohexanon: 0.5 g des ölichen Ketons XVI werden in 3 ccm 30-proz. Bromwasserstoff-Eisessig gelöst. Nach kurzer Zeit gießt man auf Eis und extrahiert mit Äther. Die Ätherlösung wird mit Natriumcarbonatlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand kristallisiert bei längerem Stehenlassen in währ. Alkohol. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser-Alkohol schmilzt die Verbindung bei 179°; ab 140° verfärbt sie sich.

$C_{15}H_{15}N$ (209.3) Ber. C 86.07 H 7.23 N 6.69 Gef. C 86.10 H 7.16 N 7.18

1-[2-Methyl-skatyl]-cyclopentanon-(2)-carbonsäure-(1)-äthylester (XVIII): Die Verbindung wird analog den früher beschriebenen Umsetzungen aus 2-Methyl-3-piperidinomethyl-indol und Cyclopentanon-(2)-carbonsäure-(1)-äthylester dargestellt; Schmp. 103°.

$C_{18}H_{21}O_3N$ (299.3) Ber. N 4.77 Gef. N 4.75

α -[2-Methyl-skatyl]-adipinsäure (XIX): 5 g der Verbindung XVIII werden in 20 ccm 2n NaOH auf dem Wasserbad 1 Stde. erwärmt. Man extrahiert mit Äther, um Ausgangsmaterial zu entfernen, und säuert mit verd. Salzsäure an. Hierbei fallen 2,2 g einer farblosen Verbindung aus, die nach dem Umkristallisieren bei 170–173° schmilzt.

$C_{16}H_{19}O_4N$ (299.3) Ber. C 66.50 H 6.58 N 4.84 Gef. C 66.29 H 6.64 N 5.00

85. Fritz Kaiser: Die papierchromatographische Trennung von Herz-giftglykosiden

[Aus dem Chemischen Forschungslaboratorium der C. F. Boehringer & Soehne G.m.b.H., Mannheim, Leiter: E. Haack]

(Eingegangen am 29. Januar 1955)

Mit den neuen Lösungsmittelgemischen: I. Xylol-Methyläthylketon 1:1, gesättigt mit Formamid, und II. Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid 50:50:6.5, gelingt eine vollständige chromatographische Trennung von Digitalis-Glykosiden und Aglykonen in aufsteigenden Lauf auf mit Formamid imprägniertem Papier. Gemisch I ist für zahlreiche andere wenig wasserlösliche Herzgiftglykoside gut verwendbar. Es werden weitere Lösungsmittelsysteme für spezielle Trennungen und die R_F -Werte der wichtigsten in Herzgiften vor kommenden Zucker in verschiedenen Fließmitteln angegeben.

Durch Mehrfachchromatographie in den Gemischen Xylol-Methyläthylketon 2:1 oder 3:1 werden die α - und β -Formen von Acetyl-digitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin getrennt und identifiziert.

Über die Papierchromatographie von Digitalis- und anderen Herzgiftglykosiden sind in den letzten Jahren mehrere Arbeiten^{1–4)} bekannt geworden,

¹⁾ E. Habermann, W. Müller u. A. Schregelmann, Arzneimittel-Forsch. 3, 30 [1953]. ²⁾ R. Tschesche, G. Grimmer u. F. Seehofer, Chem. Ber. 86, 1235 [1953].

³⁾ E. Schenker, A. Hunger u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 37, 680 [1954].

⁴⁾ R. Tschesche u. F. Seehofer, Chem. Ber. 87, 1108 [1954].

die sich in der Verfahrensweise und in ihrer Brauchbarkeit beträchtlich unterscheiden. So sind nach den üblichen Trennungsmethoden mit Wasser als stationärer Phase nur bei den wasserlöslichen Herzgiften von der Art der genuinen Strophanthus- und Convallariaglykoside einwandfreie Ergebnisse erreicht worden. Dagegen ist zur papierchromatographischen Trennung aller übrigen nicht oder nur wenig wasserlöslichen Herzglykoside die „echte Verteilungchromatographie an Papier“ geeignet und noch ausbaufähig. Bei diesem Verfahren werden Formamid^{5, 6)} oder Pentanol und Octanol²⁾ als stationäre Phasen verwendet.

Infolge der meist großen Anzahl und der recht unterschiedlichen Löslichkeiten der in den Pflanzenextrakten vorhandenen Glykoside ist eine ausreichende Verteilung aller Komponenten auf einem Blatt mit einem einzigen Fließmittel nicht zu erwarten. Es sind deshalb zur Trennung der Primärglykoside einerseits und der Sekundärglykoside und Aglykone andererseits verschiedene Lösungsmittelsysteme – häufig nach der Durchlaufmethode unter Verzicht auf reproduzierbare R_F -Werte^{5, 6)} – angewendet worden. R. Tschesche und Mitarb.²⁾ erhalten auf diese Weise eine sehr gute Auf trennung der genuinen Digitalisglykoside. Die Trennung der übrigen Glykoside und Aglykone kann dagegen nach allen angeführten Methoden noch nicht voll befriedigen.

Wir haben nun unter Verwendung von Propylenglykol, Äthylenglykol und Formamid als stationäre Phasen eine große Anzahl von neuen Lösungsmittelgemischen im aufsteigenden Lauf erprobt, wobei sich in den meisten Fällen Formamid den Glykolen überlegen erwies. Die Versuche ergaben, daß auch mit Formamid mischbare Lösungsmittel Verwendung finden können. Diese müssen dann aber mit einem anderen Lösungsmittel, das sich mit Formamid nur teilweise mischt, so kombiniert werden, daß sich bei Formamidzusatz noch ein Zweiphasensystem bildet.

Die meisten Gemische aus Benzol, Toluol, Xylol, Hexan, Heptan, Cyclohexan, Dekalin, Isopropyläther (a) und Methyläthylketon, Methylisobutylketon, Dioxan, Tetrahydrofuran, Äthylacetat, Butylacetat (b) sind mindestens für einen Teil der zu trennenden Sekundärglykoside verwendbar.

In der gleichen Weise geben Gemische von Chloroform mit den unter (b) genannten Lösungsmitteln brauchbare bis sehr gute Trennungen im Bereich der genuinen Glykoside. Am besten geeignet sind

für die Glykoside der Digitoxinstufe und die Aglykone Gemisch I: Xylol-Methyläthylketon 1:1, gesättigt mit Formamid;

für die Primärglykoside Gemisch II: Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid 50:50:6.5.

Sämtliche in Frage kommenden herzaktiven Substanzen aus *Digitalis purpurea*, *lanata*, *ferruginea* usw. verteilen sich in diesen beiden Chromatogrammen auf die gesamte Skala der R_F -Werte. Mit gleich gutem Erfolg lassen sich die weniger wasserlöslichen Strophanthusglykoside und -aglykone mit Gemisch I trennen (vergl. Tafel 1 mit Chromatogrammen). Dabei beträgt die Entwicklungszeit nach dem aufsteigenden Verfahren mit dem am besten geeigneten Papier Schleicher & Schüll 2043 b Mgl nur 3 bis 4 bzw. 14 Stdn. bei

⁵⁾ O. Schindler u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 34, 108 [1951].

⁶⁾ K. B. Jensen, Acta pharmacol. toxicol. [Köbenhavn] 9, 99 [1953].

Verwendung von Streifen der Größen $9,5 \times 28$ cm (kleine Streifen) bzw. $16,5 \times 45$ cm (große Streifen). Die genuinen Glykoside chromatographieren wir ausschließlich auf den kleinen Streifen, während die Trennung der Sekundär-glykoside und Aglykone vorteilhafter auf den großen erfolgt.

Die Kapazität des mit Formamid (20 % in Aceton) imprägnierten Papiers ist relativ hoch. Es können aufgetragen werden bei reinen Substanzen je nach

Tafel 1. R_F -Werte und Papierchromatogramme von Herzgift-glykosiden bzw. Geninen

| Glykoside bzw. Genine | $R_F \cdot 100$ | | I | II |
|---|-----------------|----|----|----|
| | I | II | | |
| 1 Digitalinum verum ... | | 16 | 20 | |
| 2 Digilanid C | | 33 | 19 | |
| 3 Digilanid B | | 47 | | |
| 4 Digilanid A | | 85 | | |
| 5 Desacetyl digilanid C .. | | 13 | | |
| 6 Desacetyl digilanid B .. | | 19 | 18 | |
| (Purpureaglykosid B) | | | | |
| 7 Desacetyl digilanid A .. | | 50 | 17 | |
| (Purpureaglykosid A) | | | | |
| 8 Strospesid | 7,5 | 61 | 16 | |
| 9 Digoxin | 16 | | 15 | |
| 10 Digoxigenin | 32 | | | |
| 11 Gotoxin | 29 | | | |
| 12 Gitoxigenin | 42 | | | |
| 13 Acetyl digoxin- α | 39 | | | |
| 14 Acetyl digoxin- β | 45 | | | |
| 15 Acetyl gitoxin- α | 59 | | | |
| 16 Acetyl gitoxin- β | 64 | | | |
| 17 Digitoxin | 69 | | | |
| 18 Digitoxigenin | 81 | | | |
| 19, 20 Acetyl digitoxin- $\alpha + \beta$ | 90-95 | | | |
| Oleandrin*) | 93 | | | |
| Oleandrinogenin | 72 | | | |
| Neriifolin*) | 55 | | | |
| Cymarin | 55 | | 9 | |
| Allocymarin | 48 | | | |
| Strophanthidin | 40 | | 8 | |
| Allostrophanthidin | 32 | | | |
| Isostrophanthidin | 76 | | | |
| Strophanthidol | 26 | | | |
| Cymarol | 36 | | | |
| Emicymarin | 11 | | | |
| Alloemicymarin | 7 | | | |

*) Wir danken Herrn Prof. R. Tschesche für die Überlassung dieser Substanzproben

I = Xylol-Methyläthylketon 1:1, gesätt. mit Formamid

II = Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid 50:50:6,5

Anzahl der Komponenten bis 500 μg des Gemisches auf große und bis 200 μg auf kleine Streifen, bei Digitalis-Rohextrakten bis 2 mg auf große und 500 bis 1000 μg auf kleine Streifen.

Die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte ist abhängig von der Art der Formamidimprägnierung des Papiers und von dem Alter des Lösungsmittelgemisches. Bei Einhaltung der im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen sind jedoch die R_F -Werte innerhalb der Fehlergrenzen, die sich vor allem aus der von der Startlinie in Wanderungsrichtung zunehmenden Vergrößerung der Flecken ergeben, sehr gut reproduzierbar.

Zur Sichtbarmachung der einzelnen Substanzen sind mehrere Verfahren bekannt, die entweder auf Farbreaktionen oder auf der nach Behandlung mit Trichloressigsäure^{7, 8)} bzw. Antimontrichlorid⁸⁾ auftretenden Fluorescenz im ultravioletten Licht beruhen. Meist wird man die Trichloressigsäure-Methode als die geeignete anwenden. In einzelnen Fällen haben wir es jedoch vorteilhaft gefunden, verschiedene Nachweisreaktionen miteinander zu kombinieren. So lassen sich z. B. unbekannte Substanzen besser definieren, wenn man auf je einem Chromatogramm mit Xanthydrol⁹⁾ oder *p*-Dimethylamino-benzaldehyd auf Desoxyzucker, mit der Kedde-Reaktion¹⁰⁾ auf den ungesättigten Lactonring und mit der Fluorescenzreaktion auf Zugehörigkeit zur A-, B- oder C-Reihe prüft. Digitoxigenin-Derivate fluorescieren leuchtend gelb, Gitoxigenin-Derivate leuchtend blau und Digoxigenin-Derivate matt stahlblau.

Zur Aufklärung und Identifizierung von unbekannten Substanzen in Extrakten ist es meist erwünscht, bestimmte Bereiche des Standardchromatogrammes I noch weiter auseinanderzuziehen. Das kann auf folgende Weise geschehen:

1. Substanzen mit R_F -Werten zwischen 60 und 100 lassen sich in die Mitte und den unteren Teil des Chromatogrammes „drücken“ und somit auf einen größeren Chromatogrammbereich verteilen, wenn man entweder den Xylolanteil des Gemisches auf 2:1 oder 3:1 erhöht, oder an Stelle des aromatischen Kohlenwasserstoffs einen aliphatischen einsetzt. Die Substanzen aus der unteren Hälfte des Standardchromatogrammes erhalten dann bedeutend niedrigere R_F -Werte bzw. bleiben ganz auf dem Startpunkt sitzen.

2. Umgekehrt erreicht man ein schnelleres Wandern der Komponenten im unteren Bereich durch Verwendung von Benzol anstatt Xylol im Gemisch I. Besonders weit auseinandergezogen werden die langsam laufenden Glykoside in den Lösungsmittelgemischen Chloroform-Methyläthylketon 3:1 und 2:1.

3. Die scharfe Trennung von Substanzen mit geringen Unterschieden ihrer R_F -Werte kann in besonderen Fällen durch Mehrfachchromatographie erreicht werden.

⁷⁾ A. B. Svendsen u. K. B. Jensen, *Pharmac. Acta Helveticae* 25, 241 [1950].

⁸⁾ F. Jaminet, *J. Pharmac. Belgique* 5, 297 [1950].

⁹⁾ M. Pesez, *Ann. pharmac. frang.* 10, 104 [1952].

¹⁰⁾ E. Heftmann u. A. J. Levant, *J. biol. Chemistry* 194, 703 [1952].

Als Beispiel für Methode 1 sind die R_F -Werte von Glykosiden aus dem oberen Drittel des Standardchromatogrammes I und die der Acetylierungsprodukte von Gitoxigenin in dafür in Frage kommenden Lösungsmittelgemischen in der Tafel 2 angeführt.

Tafel 2. R_F -Werte in anderen Lösungsmittelgemischen

| Glykoside und Genine | Lösungsmittelgemisch | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Digitoxin | 59 | 31 | 40 | | 39 | 15 |
| Digitoxigenin | 70 | 51 | | 53 | 59 | 33 |
| Acetyl-digitoxin- α | 81 | 57 | 62 | | 73 | 30 |
| Acetyl-digitoxin- β | 87 | 63 | 70 | | 73 | 30 |
| Gitoxigenin-16-acetat | 65 | 41 | 46 | 43 | 52 | 21 |
| (Oleandrinogenin) | | | | | | |
| Gitoxigenin-3-acetat | 93 | 64 | 59 | 59 | 70 | 35 |
| Gitoxigenin-3,16-diacetat | 100 | 94 | 85 | 84 | 92 | 61 |
| 1: Xylool-Methyläthylketon 2:1 | | | | | | |
| 2: Xylool-Methyläthylketon 3:1 | | | | | | |
| 3: Xylool-Dioxan 1:1 | | | | | | |
| 4: Heptan-Methyläthylketon 1:1 | | | | | | |
| 5: Heptan-Essigester 1:2 | | | | | | |
| 6: Heptan-Tetrahydrofuran 1:1 | | | | | | |

gesättigt mit Formamid

Nach Methode 3 haben wir die Aufeinanderfolge der von Stoll¹¹⁾ erstmals isolierten α - und β -Acetylglykoside im Chromatogramm untersucht: Die reinen α - und β -Glykoside werden nach der Vorschrift von Stoll¹²⁾ hergestellt, isoliert und auf Standardchromatogramme I aufgesetzt. Diese werden über Nacht entwickelt, aus der Chromatographierkammer genommen und bei Zimmer-temperatur (Ventilator) vom Fließmittel befreit, wobei die Formamid-Imprägnierung erhalten bleibt. Anschließend wird erneut entwickelt und nach abermaligem Trocknen und Entwickeln über Nacht schließlich mit Trichloressigsäure behandelt. Die Gesamlaufzeit beträgt ca. 36 Stunden. Zur Verfolgung des Trennungsvorgangs stellt man auf Vergleichschromatogrammen die Stellungen der Acetylglykoside auch bereits nach dem ersten und zweiten Lauf fest. Die in Tafel 3 wiedergegebenen Zahlen machen die Trennungsverbesserung nach jedem Lauf deutlich und zeigen, daß in allen Fällen das α -Acetylglykosid den niedrigeren R_F -Wert besitzt.

Zur genauen Aufklärung neuer Komponenten aus pflanzlichen Extrakten ist die Identifizierung der Spaltprodukte unerlässlich. Auch hier leistet die Papierchromatographie rasche und gute Dienste. — Man fertigt eine größere Anzahl von Chromatogrammen an, macht auf einem Teil von ihnen die getrennten Substanzen sichtbar und schneidet nach diesen Leitchromatogrammen aus den übrigen Streifen die zu untersuchenden Flecken aus. Durch

¹¹⁾ A. Stoll u. W. Kreis, Helv. chim. Acta 16, 1049 [1933]; Helv. chim. Acta 18, 120 [1935].

¹²⁾ A. Stoll, W. Kreis u. J. Renz, Helv. chim. Acta 17, 592 [1934]; Helv. chim. Acta 35, 1310 [1952].

Elution mit Chloroform-Methanol und Eindampfen der Elutionslösungen erhält man so die Substanzen in Mengen von einigen 100 µg bis einigen mg. Diese werden dann teils in alkalischer, teils in saurer Lösung gespalten. Falls Acetylglykoside vorgelegen haben, erhält man bei der alkalischen Spaltung die entacetylierten Glykoside. Die saure Hydrolyse liefert Aglykone und Zucker,

Tafel 3. Wanderungsstrecken von α - und β -Acetylglykosiden, bezogen auf die Entfernung Startlinie – oberer Rand, in Prozenten

| Glykosid | Xylo-Methyläthylketon 2:1 | | | Xylo-Methyläthylketon 3:1 | | |
|-------------------------------|---------------------------|--------|--------|---------------------------|--------|--------|
| | Lauf 1 | Lauf 2 | Lauf 3 | Lauf 1 | Lauf 2 | Lauf 3 |
| Acetyldigoxin- α | 18 | 28 | 43 | 6.5 | 12 | 20 |
| Acetyldigoxin- β | 22.5 | 34 | 53 | 9 | 15.5 | 26 |
| Acetylgitoxin- α | 35 | 49 | 70 | 15 | 27 | 39 |
| Acetylgitoxin- β | 42 | 58 | 81 | 18 | 32 | 46 |
| Acetyldigitoxin- α ... | 81 | 89 | 100 | 57 | 79 | 94 |
| Acetyldigitoxin- β ... | 87 | 91 | 100 | 63 | 85 | 97 |

die sich alle wiederum auf Papierchromatogrammen nachweisen und mit bekannten Substanzen verglichen lassen. Auf diese Weise konnten wir u. a. Acetyldigoxin, Acetylgitoxin, Strospesid in Digitalis-Extrakten bereits sicher identifizieren, bevor uns reine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen.

Die bei der Spaltung entstehenden Zucker werden nach dem üblichen papierchromatographischen Verfahren mit Wasser als stationärer Phase entwickelt. In Tafel 4 sind die R_F -Werte der wichtigsten Zucker zusammengestellt.

Tafel 4. R_F -Werte von in Herzgiften vorkommenden Zuckern

| Lösungsmittel | $R_F \cdot 100$ | | | | | | | |
|---|-----------------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
| | Gluc- | Rham- | Digi- | Cyma- | Olean- | Digi- | Theve- | Digi- |
| ose | nose | toxose | rose | drose | talose | tose | nose | nose |
| sek.-Butanol-Wasser | 28 | 55 | 70 | 85 | 81 | 55 | 61 | 78 |
| <i>n</i> -Butanol-Wasser | 8 | 27 | 58 | 74 | 84 | 37 | 48 | 68 |
| <i>n</i> -Butanol- <i>tert.</i> -Butanol-Wasser 1:1:1 | 25 | 36 | 59 | 89 | 76 | 43 | 55 | |
| <i>n</i> -Butanol-Äthanol-Wasser 4:1:5 | 12 | 34 | 65 | 82 | | 51 | | 74 |
| <i>n</i> -Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 | 17 | 42 | 66 | 85 | 87 | 52 | 62 | 76 |
| Äthylacetat-Eisessig-Wasser 5:2:2 | 25 | 53 | 81 | 100 | 95 | 60 | 70 | 91 |
| <i>n</i> -Butanol-Pyridin-Wasser-Benzol 50:30:30:4:5 | 36 | 65 | 87 | 95 | 100 | 71 | | |
| Äthylacetat-Pyridin-Wasser 25:10:35 | 10 | 44 | 88 | 100 | 100 | 52 | | 100 |

Nachdem nun die einwandfreie papierchromatographische Trennung der Digitalisglykoside gelungen ist, bietet sich die häufig – zuletzt von R. Wasicky¹³⁾ – geforderte Möglichkeit, „die für die therapeutische Wirkung maß-

¹³⁾ Arzneimittel-Forsch. 4, 562 [1954].

gebenden Bestandteile chemisch quantitativ zu kennzeichnen". Die Analyse von Reinglykosiden und Gemischen auf chromatographischem Wege wurde von K. B. Jensen¹⁴⁾ und R. Tschesche²⁾ durchgeführt. Wir bestimmen seit einiger Zeit die Hauptglykoside der *Digitalis purpurea* quantitativ direkt aus den Chromatogrammen I der Extrakte und werden über die Ergebnisse in anderem Zusammenhang berichten.

Beschreibung der Versuche

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel, mit Ausnahme von Formamid und Methyläthylketon (Merck, reinst), werden vor Gebrauch destilliert. Gemisch I und die anderen zur Trennung der weniger wasserlöslichen Herzgifte zu verwendenden Lösungsmittelsysteme werden durch Mischen der Komponenten im jeweils erforderlichen Verhältnis unter Zusatz von etwas mehr als der zur Sättigung notwendigen Menge Formamid hergestellt.

Chloroform enthaltende Systeme werden mit nur 80% der Sättigungskonzentration an Formamid versetzt. So erhält man das Gemisch II durch Mischen von 50 Tln. Chloroform, 50 Tln. Tetrahydrofuran und 6.5 Tln. Formamid.

Apparatur: Es wird immer nach dem aufsteigenden Verfahren entwickelt. Dieses hat den Vorteil größerer Einfachheit in der Handhabung, besonders bei der gleichzeitigen Anfertigung von mehreren Chromatogrammen. Als Entwicklungskammern werden rechteckige Glaskästen von 29 cm Länge, 20 cm Tiefe und 48 cm Höhe für große Streifen und von 33 cm Länge, 26 cm Tiefe und 30 cm Höhe für kleine Streifen verwendet. Die Kästen sind mit Glasscheiben bedeckt, die zur Abdichtung mit Streifen aus Schaumgummi beklebt sind. Im Innern sind längs der Schmalseiten zwei in Korken gesteckte Glasstäbe eingeklemmt. Zwei lange Glasstäbe werden durch die doppelt gelochten Chromatogramme gesteckt und mit ihren Enden auf die eingeklemmten Glasstäbe gelegt. Die Chromatogramme hängen dann mit dem unteren Ende in dem den Boden des Kastens 1–3 cm hoch bedeckenden Lösungsmittelgemisch. Durch Verschieben der Korken in vertikaler Richtung kann man die Chromatogramme senken und so dem bei längerem Gebrauch abnehmenden Flüssigkeitsspiegel folgen. In einem Kasten können 8 große und bis zu 20 kleine Streifen gleichzeitig entwickelt werden.

Zur routinemäßigen Erprobung von Lösungsmittelgemischen haben sich die Glaszylinder mit verstellbarer Aufhängevorrichtung nach H. Hellmann¹⁵⁾ gut bewährt. Wir verwenden sie in den Größen 50 × 24 cm für große und 31 × 12 cm für kleine Streifen.

Vorbereiten der Chromatogramme: Die Papierstreifen werden in eine dicht verschließbare Wanne aus nichtrostendem Stahl, in der sich eine Lösung von 20% Formamid in Aceton befindet, eingelegt. Sie sollen von der Flüssigkeit ganz bedeckt sein. Nach 5 Min. werden die Streifen herausgenommen, zwischen Filtrierpapierbogen schnell abgepreßt und kurze Zeit an der Luft aufgehängt. Diese Arbeitsweise muß genau eingehalten werden, weil die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte vom Grad der Formamidsättigung abhängig ist.

Tafel 5 zeigt die Formamidaufnahme des Papiers Schleicher & Schüll 2043 b Mgl bei verschiedener Imprägnierungsdauer und die R_F -Werte von auf diesen Streifen chromatographierten Herzgiftglykosiden.

Eine Gleichgewichtseinstellung durch längeres Einhängen der Chromatogramme in den Dampfraum des Fließmittels ist nicht erforderlich. Auch bleiben Temperaturschwankungen von 1 bis 4° auf die R_F -Werte ohne nennenswerten Einfluß. Die in den Tafeln angeführten Werte gelten für eine Versuchstemperatur von $20 \pm 2^\circ$.

Chromatographie: Glykosidgemische, Pflanzenextrakte und Reinsubstanzen werden in Chloroform-Methanol 1:1 gelöst und je nach Konzentration mit einer Mikropipette in Anteilen zu 3 bis 15 μ l auf die Startpunkte aufgetragen. Die großen Streifen werden

¹⁴⁾ Acta pharmacol. toxicol. [Köbenhavn] 10, 69 [1954].

¹⁵⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 288, 95 [1951].

mit 5–7, die kleinen Streifen mit 3–5 Startstellen besetzt. Auf diese Weise kann man in einem Kasten mit 8 großen Chromatogrammen 50–60 Substanzgemische gleichzeitig chromatographieren.

Die Chromatographierkammer wird nach dem Einhängen der Chromatogramme mit der Glasplatte bedeckt, auf die noch ein ausreichendes Gewicht (Bleiklotz) gelegt wird.

Tafel 5

| Dauer der Imprägnierung | aufgenommen g Formamid pro g Papier | $R_F \cdot 100$ | | |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------------|---------|-----------|
| | | Digoxin | Gitoxin | Digitoxin |
| 2 Min. | 0.290 | 24 | 38 | 79 |
| 3 Min. | 0.340 | 21 | 35 | 76 |
| 4 Min. | 0.360 | 19 | 32 | 72 |
| 5 Min. | 0.375 | 16 | 29 | 69 |
| 6 Min. | 0.375 | 16 | 29 | 69 |

Die Ränder des Kastens drücken sich dann so tief in die Schaumgummiauflage ein, daß ein besonderes Abdichten mit einem Schmiermittel nicht mehr nötig ist. — Die plan-geschliffenen Deckel der Glaszyylinder werden mit einer Paste aus Glycerin und Stärke abgedichtet.

Wenn das Lösungsmittelgemisch den oberen Papierrand erreicht hat, werden die Chromatogramme herausgenommen und im Trockenschrank mit Umluft bei 80–100° vollständig vom Lösungsmittel und der Formamidimprägnierung befreit.

Wir lassen bei unseren Routineuntersuchungen das Gemisch I in der Entwicklungs-kammer, bis es weitgehend aufgebraucht ist. Dabei verarmt es mit der Zeit ein wenig an Methyläthylketon, was einen geringen Abfall der R_F -Werte zur Folge hat. Wird das Gemisch nach zwei- bis dreimaliger Verwendung erneuert, so tritt dieser Effekt nicht auf.

Die sich bei Dauergebrauch des Lösungsmittels verringende Laufgeschwindigkeit der Herzgiftglykoside gibt aber kaum zu Irrtümern bei der Chromatogrammauswertung Anlaß, da die gut unterscheidbaren Fluoreszenzen der Glykoside und Aglykone der A-, B- und C-Reihe nach Behandlung mit Trichloressigsäure im allgemeinen ein sicheres Identifizieren erlauben. Das Gemisch II zur Trennung der Digitalane wird dagegen nur ein- bis zweimal verwendet.

Als Sprühreagens verwenden wir hauptsächlich das von Jensen⁶⁾ eingeführte Trichloressigsäure-Chloramin-Reagens in dem uns vorteilhafter erscheinenden Mischungsverhältnis von 15:1. Bei höherem Chloraminanteil fluorescieren die Substanzen der B-Reihe gelb, besonders wenn sie in nur geringer Menge vorliegen, und können deshalb zu Verwechslungen mit Substanzen der A-Reihe Anlaß geben. Von der Trichloressigsäurelösung — 25-proz. in Äthanol — stellen wir immer den Bedarf für eine Woche auf Vorrat her, während die 3-proz. wäsr. Chloraminlösung jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt und mit der Trichloressigsäurelösung gemischt wird.

Die besprühten Chromatogramme werden im Trockenschrank 3–4 Min. auf 120° erhitzt und sind dann zur Auswertung im ultravioletten Licht bereit.