

spektren, die mit dem von B_{12} identisch sind; sie besaßen auch beide noch erhebliche mikrobiologische Aktivität, die etwa 20—40 % derjenigen von Vitamin B_{12} betrug. Auch beim Abbau mit 0,1-n. NaOH entstand in geringer Ausbeute eine kristallisierte, aber mikrobiologisch inaktive Säure, die noch das unveränderte Spektrum besass.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

12. Nachweis und Trennung digitaloider Glykoside und Aglykone durch Chromatographie auf imprägniertem Filterpapier.

Glykoside und Aglykone, 70. Mitteilung¹⁾

von O. Schindler und T. Reichstein.

(4. XII. 50.)

Die Isolierung, Trennung, Identifizierung und Reinheitsprüfung digitaloider Glykoside und Aglykone mit den üblichen präparativen Methoden benötigt relativ viel Substanz und Zeitaufwand. Wir prüften daher die Möglichkeit, für diesen Zweck die Papierchromatographie nutzbar zu machen. Für den Nachweis der Glykoside und Aglykone in Digitalis-Blättern und Extrakten haben kürzlich *Svensen & Jensen*²⁾ diese Methode als brauchbar befunden³⁾. Die Papierchromatographie wurde zuerst zum Nachweis von Aminosäuren⁴⁾, später von Zuckern⁵⁾, Purin- und Pyrimidinderivaten⁶⁾ und vielen anderen Stoffgruppen⁷⁾, in letzter Zeit auch bei Steroiden⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾, benutzt. Sie hat teilweise sehr grosse Dienste geleistet, da sie rasch arbeitet, oft mit sehr geringen Substanzmengen auskommt und wenig Hilfsmittel benötigt. Im folgenden wird die Ausführungsform be-

¹⁾ 69. Mitteilung, H. J. Huber, F. Blindenbacher, K. Mohr, P. Speiser & T. Reichstein, Helv. **34**, 46 (1951).

²⁾ A. B. Svensen & K. B. Jensen, Pharmac. acta Helv. **25**, 241 (1950).

³⁾ Papierchromatographie von Flavanol-Glykosiden wurde schon von S. H. Wender & T. B. Gage, Science **109**, 287 (1949) und E. C. Bate-Smith & R. G. Westall, Biochim. et Biophys. Acta **4**, 427 (1950) beschrieben.

⁴⁾ R. Consden, A. H. Gordon & A. J. P. Martin, Biochem. J. **38**, 224 (1944); vgl. ⁷⁾.

⁵⁾ S. M. Partridge, Nature **158**, 270 (1946); Biochem. J. **42**, 238 (1948); M. A. Jeremy & F. A. Isherwood, Biochem. J. **44**, 402 (1949).

⁶⁾ E. Vischer & E. Chargaff, J. Biol. Chem. **176**, 703 (1948); E. Chargaff, E. Vischer, R. Doniger, C. Green & F. Misani, J. Biol. Chem. **177**, 405 (1949).

⁷⁾ Chromatographic Analysis, Discussions of the Faraday Society No. 7 (Gurney & Jackson, London und Edinburgh 1949).

⁸⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Kentmann, J. Biol. Chem. **177**, 109 (1949); Science **111**, 6 (1950).

⁹⁾ A. L. Haskins, A. J. Sherman & W. M. Allen, J. Biol. Chem. **182**, 429 (1950).

¹⁰⁾ D. Kritchevsky & M. Calvin, Am. Soc. **72**, 4330 (1950).

schrieben, die wir in letzter Zeit für den genannten Zweck benützten und bei der nach dem Vorschlag von *Zaffaroni* und Mitarbeitern Filterpapier verwendet wird, das mit Formamid getränkt ist¹⁾²⁾.

Zur Sichtbarmachung digitaloider Glykoside und Aglykone hat sich von den bekannten Farbreaktionen³⁾ die *Raymond*-Reaktion⁴⁾ (*m*-Dinitrobenzol und Alkali) als besonders geeignet erwiesen⁵⁾. Sie ist zwar nur zum Nachweis der einfach ungesättigten Fünfringlactone vom Digitalis-Strophanthus-Typ (I) brauchbar. Die doppelt ungesättigten Sechsringlactone (Cumaline) vom Scilla-Bufo-Typ (II) geben



keine Färbung⁶⁾. Auch ist diese Reaktion, wie viele andere Farbreaktionen, nicht streng spezifisch⁷⁾, dafür gibt sie aber noch mit 0,005 mg Substanz einen sehr deutlichen Fleck, ist also relativ empfindlich.

Für die eigentliche Chromatographie haben wir uns, wie erwähnt, weitgehend auf die Arbeiten von *Zaffaroni* und Mitarb.¹⁾ stützen können. Diese Forscher zeigten, dass sich Steroide besonders gut auf Papier chromatographieren lassen, das mit Formamid oder Propylenglykol als stationäre Phase getränkt ist. Als mobile Phase verwendeten

¹⁾ *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Kentmann*, J. Biol. Chem. **177**, 109 (1949); Science **111**, 6 (1950).

²⁾ Mit anorganischen oder organischen Stoffen imprägniertes Filterpapier wurde schon früher benützt, vgl. die Angaben bei *Kritchevsky & Calvin*⁸⁾.

³⁾ Vgl. die Zusammenstellung bei *P. Bellet*, Ann. pharmac. franç. **8**, 471 (1950).

⁴⁾ *W. D. Raymond*, Analyst **63**, 478 (1938), **64**, 113 (1939); *R. C. Anderson & K. K. Chen*, J. Am. Pharmac. Assoc. **35**, 353 (1946); *T. Canbäck*, Svensk Farmac. Tidskr. **54**, 201 (1950).

⁵⁾ *Svensen & Jensen* (loc. cit.) benützten die Fluoreszenz im UV.-Licht nach Erhitzen mit Trichloressigsäure, wobei in manchen Fällen schon 0,25–1 γ nachweisbar waren.

⁶⁾ Für den Nachweis dieser Stoffe wäre die *Liebermann-Burchard*-Reaktion besonders in der Modifikation von *A. Stoll & A. Hofmann*, Helv. **18**, 401 (1935) brauchbar, obgleich sie mindestens 10mal weniger empfindlich ist. Sie gestattet durch die Verschiedenheit der auftretenden Färbungen auch noch eine zusätzliche Differenzierung. Hingegen versagt sie auf dem mit Formamid getränkten Papier nahezu vollständig.

⁷⁾ Die Reaktion soll auf reaktive Methylengruppen ansprechen. In der von uns benützten Ausführungsform auf Papier reagierten aber weder Pregnen-(5)-ol-(3)-on-(20), noch Testosteron oder Progesteron⁹⁾, dagegen reagierte Acetophenon (relativ schwach). Positiv reagierten die reduzierenden Steroide: Desoxycorticosteron, Cortison, Corticosteron etc. Diese Stoffe gaben aber zuerst einen gelben Fleck, der dann violett wurde. Die Stoffe vom Typus I gaben einen violetten Fleck, der bald blau wurde. An- oder Abwesenheit von Formamid hat keinen wesentlichen Einfluss.

⁸⁾ *D. Kritchevsky & M. Calvin*, Am. Soc. **72**, 4330 (1950).

⁹⁾ *Haskins* und Mitarb. müssen eine andere Ausführungsform benützt haben, da sie diese Reaktion zum Nachweis von Progesteron auf Papier benützten.

sie Benzol oder Toluol. Glykoside und Aglykone bewegen sich mit diesen Lösungsmitteln meistens zu langsam. Brauchbare Geschwindigkeiten wurden mit Benzol-Chloroform-Gemischen oder mit reinem Chloroform erzielt. Bei Verwendung von Chloroform ist dann nur Formamid als stationäre Phase brauchbar, da Propylenglykol in Chloroform zu leicht löslich ist. Sogar bei Verwendung von reinem Chloroform ist die Wanderungsgeschwindigkeit vieler Glykoside und Aglykone noch relativ gering, so dass ihre Auftrennung noch ungenügend ist, wenn die Lösungsmittelfront bei normaler Papierlänge von ca. 50 cm das untere Ende erreicht hat, was ca. 5—7 Stunden beansprucht. Wir haben daher, wie *Zaffaroni* und Mitarb., auf die Bestimmung der R_F -Werte verzichtet und die Versuche meistens 24 Stunden lang laufen gelassen, wobei das Lösungsmittel in den unteren Trog abtropfte. Die von den einzelnen Glykosiden durchlaufenden Strecken sind bei Einhaltung standardisierter Bedingungen relativ konstant bzw. der Zeit proportional. Für Identitätsprüfungen ist es jedoch angezeigt, die reine Vergleichssubstanz auf demselben Papierstreifen nebenher laufen zu lassen. Falls man Gemische von mehreren rasch und mehreren langsam laufenden Komponenten untersuchen will, lässt es sich nicht umgehen, mindestens zwei Versuche anzusetzen. Der erste wird abgebrochen, wenn die Lösungsmittelfront das Papierende erreicht hat, so dass man sicher ist, dass keine Komponente verloren geht. Die rasch laufenden Stoffe sind dann oft auch schon genügend aufgetrennt. Ein zweiter Versuch von längerer Zeitspanne dient zur Trennung der langsam wandernden Stoffe, wobei die rasch wandernden in der Regel teilweise oder ganz heruntergewaschen werden: Für die mittelrasch wandernden Komponenten kann oft noch ein dritter Versuch nötig werden, was meistens aus dem Resultat des ersten bereits ersichtlich ist.

Wie aus der weiter unten gegebenen Tabelle und den Figuren hervorgeht, ist die Methode sehr geeignet zur Reinheitsprüfung sowie zur Untersuchung von Gemischen verschiedener Aglykone und Monoglykoside. Die sehr sauerstoffreichen Di- und Polyglykoside wandern unter den angegebenen Bedingungen zu langsam. Für die Trennung solcher Stoffe müssen andere Lösungsmittel verwendet werden.

Wir haben weiter geprüft, wieweit es möglich ist, die genannte Methode zur Untersuchung von Strophanthussamen zu benutzen. Diese Samen enthalten bekanntlich meistens komplizierte Gemische von Di- und Triglykosiden, oft in teilweise acetylierter Form. Um übersichtlichere Verhältnisse zu schaffen, kann man das rohe Gemisch vor der Chromatographie zuerst enzymatisch abbauen, wobei hauptsächlich Monoglykoside entstehen. Diese Methode hat viele Vorteile, ist aber zeitraubend¹⁾, auch muss die Wirkung der schädlichen, eben-

¹⁾ Für die Untersuchung mit präparativen Methoden ist sie unserer Meinung nach die beste.

falls in den Samen enthaltenen, allomerisierenden Enzyme möglichst ausgeschaltet werden. In relativ einfacher und wirksamer Weise kann diese Methode auch nur bei lebenden (nicht erhitzten) Samen angewendet werden. Bei abgetöteten Samen muss man geeignete Enzyme zusetzen, die aber nicht immer gut wirksam sind. Ein zweiter, einfacherer, aber etwas weniger leistungsfähiger Weg, der auch weniger Aufschluss über die ursprünglichen Glykoside gibt, ist die saure Hydrolyse. Für die hier beschriebenen Versuche wurde hauptsächlich dieser Weg benutzt, er erlaubt auch die Untersuchung abgetöteter Samen. Die Hydrolyse wurde unter sehr gelinden Bedingungen durchgeführt, damit keine Anhydrisierung stattfindet; dabei werden nur die Derivate der 2-Desoxyzucker zu den Aglykonen gespalten, während die Glykoside normaler Zucker im wesentlichen unverändert bleiben.

Wie aus den Figuren hervorgeht, lassen sich auf diese Weise bei Strophanthussamen die wichtigsten Aglykone und Glykoside¹⁾ bereits mit 12 mg, also mit weniger als einem einzigen Samen, deutlich nachweisen. Selbstverständlich ist ein solcher Nachweis nur möglich, wenn ein Vergleich mit bekannten Stoffen durchgeführt werden kann²⁾. Auch dann erlaubt er keine völlig eindeutigen Schlüsse³⁾ und kann die präparative Isolierung nicht völlig ersetzen. Sehr geeignet ist die Papierchromatographie endlich zur Prüfung auf Einheitlichkeit von Kristallisaten (siehe Fig. III) sowie den durch Verteilungsoperationen oder präparative Chromatographie an Al_2O_3 ⁴⁾ gewonnenen Fraktionen.

Tabelle I zeigt die Wanderungsgeschwindigkeit verschiedener Glykoside und Aglykone. Die Absolutwerte der angegebenen Zahlen schwanken natürlich je nach den angewandten Bedingungen etwas und haben daher nur orientierenden Charakter. Wichtiger sind die relativen Werte. Bemerkenswert ist, dass viele Monoglykoside rascher wandern als die Aglykone. Mit zunehmendem Sauerstoffgehalt (Hydroxylzahl) nimmt aber auch bei den Glykosiden die Wanderungsgeschwindigkeit rasch ab.

¹⁾ Es werden dabei die Aglykone der 2-Desoxyglykoside erfasst, sowie die aus wässriger Lösung mit Chloroform ausschüttelbaren Glykoside.

²⁾ Darüber hinaus kann lediglich festgestellt werden, ob auch noch nicht identifizierbare Glykoside oder Aglykone vorhanden sind.

³⁾ Bei der hier verwendeten eindimensionalen Chromatographie kann es gelegentlich vorkommen, dass zwei Stoffe dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen und daher nicht getrennt werden. Siehe beispielsweise Strophanthidin und Substanz Nr. 762 (Fig. II).

⁴⁾ Die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten an Al_2O_3 und auf mit Formamid imprägniertem Papier sind meistens sehr stark verschieden, so dass zwei Stoffe, die sich an Al_2O_3 schlecht trennen, meistens auf Formamid-Papier leicht getrennt werden können und umgekehrt.

Tabelle I.

Abstand vom Ausgangspunkt in cm nach dem Eluieren mit den durch Schütteln mit Formamid gesättigten Lösungsmitteln.

Benzol	100%	90%	50%	41,67%			—	
Chloroform	—	10%	50%	58,33%			100%	
Zeitdauer in Stunden .	24	24	24	14	16	24	10	24
Strophanthidin								13,6
Sarverogenin ¹⁾							11,5	10,6
Sarmentogenin ²⁾								8,0
Strophanthidol ³⁾								14
Subst. Nr. 762 ⁴⁾							2,2	5
Sarmentocymarin ²⁾	4,1	7,5	25		19	22,2	>37	>37
Sarverosid ¹⁾	8,5	17		>37		>37		
Subst. Nr. 761 ⁴⁾			27			30,5		
Subst. Nr. 800 ⁵⁾			2,8			2,2		
Subst. Nr. 795 ⁵⁾						9,0		
Cymarol ³⁾	3,7	8	31		23	37	>37	
Cymarin	5,5	11		>37				
Emicymarin ⁶⁾	1,5	1,5		3	4,7			20
Subst. Nr. 799 ⁷⁾		2						4,5

>37 bedeutet, dass der Stoff vollständig ins Eluat gewandert ist.

In den abgebildeten Figuren I—IV werden die folgenden Beispiele belegt:

Fig. I. Nachweis von Cymarol und einem weiteren unbekannten Stoff in mehrmals umkristallisiertem Cymarin vom Smp. 136—137° aus *Strophanthus kombé*. Die punktiert umrandete Zone soll andeuten, dass die Färbung weniger intensiv war als bei den übrigen gefärbten Zonen.

Fig. II. Chromatographie einer Mischung von Strophanthidin, Sarverogenin, Sarmentogenin und Subst. Nr. 762. Subst. Nr. 762 und Strophanthidin werden dabei nicht getrennt. Zur Identifizierung dient eine Vergleichschromatographie, wie sie Fig. IIa darstellt, wo die genannten Stoffe als reine, einheitliche Stoffe chromatographiert werden.

¹⁾ A. Buzas, J. v. Euw & T. Reichstein, Helv. **33**, 465 (1950).

²⁾ W. A. Jacobs & M. Heidelberger, J. Biol. Chem. **81**, 765 (1929).

³⁾ W. B. Blome, A. Katz & T. Reichstein, Pharm. acta Helv. **21**, 325 (1946).

⁴⁾ J. v. Euw & T. Reichstein, Helv. **33**, 522 (1950).

⁵⁾ Siehe spätere Mitteilung.

⁶⁾ I. D. Lamb & S. Smith, Soc. **1936**, 442.

⁷⁾ Aus *Strophanthus* var. *sarmentogenifera* Nr. MPD 50, siehe spätere Mitteilung.

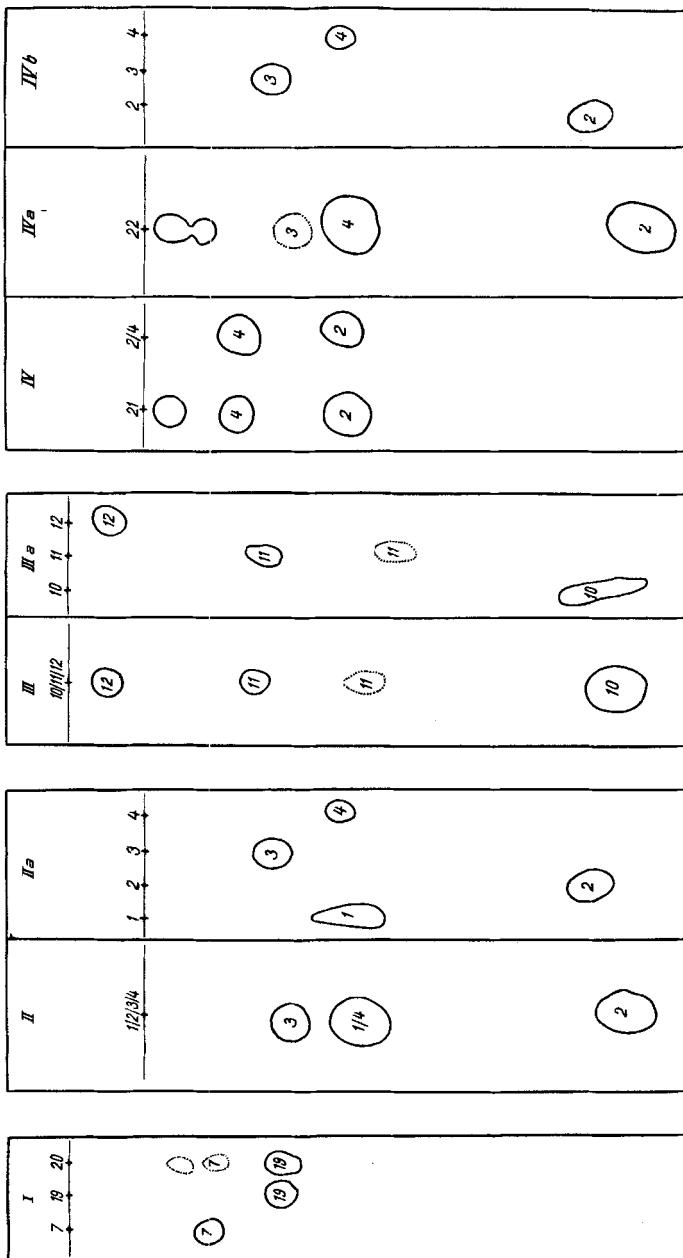


Fig. I. 7 = 0,03 mg Cynarol, 19 = 0,03 mg chromatographisch gereinigtes Cynarin, 20 = 0,03 mg nur durch Kristallisation gereinigtes Cynarin vom Smp. 138°—137° aus Strophanthus kombé. Lösungsmittel: Benzol-Chloroform (9:1). Dauer 24 Stunden.

Fig. II. Gemisch von je 0,03 mg Strophanthinid (1), Sarverogenin (2), Sarmentogenin (3) und Subst. Nr. 762 (4). Lösungsmittel: Chloroform. Dauer 24 Stunden.

Fig. IIa. Gleiche Substanzen wie in Fig. II, aber einzeln chromatographiert. Lösungsmittel: Chloroform. Dauer 24 Stunden.

Fig. III. Gemisch von je 0,03 mg Subst. Nr. 790 (10), Kristallisiert Nr. 790 aus Strophanthus intermedium (11) und Subst. 800 (12). Lösungsmittel: Chloroform-Benzol (7:5). Dauer 24 Stunden.

Fig. IIIa. Gleiche Substanzen wie in Fig. III, aber einzeln chromatographiert. Lösungsmittel: Chloroform-Benzol (7:5). Dauer 24 Stunden.

Fig. IV. 21 = 0,1 mg (entsprechend 0,8 Teilen Samen) chloroformlösliche Anteile aus mild hydrolysiertem Extrakt aus Samen von *P. DC.* aus Topo, Probe Walkowak, 2/4; 16 0,03 mg Sarverogenin (2) und Subst. Nr. 762 (4). Lösungsmittel: Chloroform. Dauer 10 Stunden.

Fig. IVa. 22 = 0,5 mg (entsprechend 3 Samen) des gleichen Materials wie 21. Lösungsmittel: Chloroform. Dauer 24 Stunden.

Fig. IVb. Mit IVa parallel geführte, getrennte Chromatogramme von je 0,03 mg Sarverogenin (2), Sarmentogenin (3) und Subst. Nr. 762 (4). Lösungsmittel und Dauer wie IVa.

Fig. III erbringt den Nachweis der Uneinheitlichkeit des Kristallisates Nr. 790¹⁾ neben den Substanzen Nr. 800 und Nr. 761. Als Vergleich sind in Fig. IIIa die erwähnten Substanzen einzeln chromatographiert.

Fig. IV stellt die Chromatographie der chloroformlöslichen Teile von hydrolysiertem Extrakt aus 0,8 Teilen Samen von *Strophanthus sarmentosus P. DC.* (aus Togo, Probe Walkowiak²⁾) dar. Die Zuordnung der Zonen erfolgte auf Grund der in Tabelle I angegebenen Wege. In Fig. IVa ist die Chromatographie des gleichen Materials aus ca. 3 Samen aufgezeichnet. Der durch den parallel gelaufenen Versuch der Fig. IVb erbrachte Nachweis von Sarmentogenin, Sarverogenin und Subst. Nr. 762 stimmt mit den Resultaten der präparativen Isolierung überein. Die in Fig. IV und IVa ersichtlichen Substanzen mit sehr kurzen Wegen entsprechen den Zonen, die mit Sarmentosid-Gemisch erhalten werden.

Experimenteller Teil.

Materialien.

Formamid: Käufliches Formamid wurde im Vakuum bei 12 Torr destilliert und die bei 104—108° siedende Fraktion verwendet. Ein solches Produkt reagierte gegen Kongo schwach sauer, war aber für die meisten Zwecke, sogar für die leicht hydrolysierbaren Glykoside Cymarin und Sarmentocymarin, gut brauchbar. Für besonders säureempfindliche Glykoside wurde es mit festem, gepulvertem K_2CO_3 $\frac{1}{4}$ Stunde geschüttelt und nach Filtration im Vakuum destilliert, unter Abtrennung eines Vorlaufes. Es reagierte dann auf Kongo nicht mehr sauer, wohl aber noch sauer auf Lackmus.

Benzol: Thiophenfreies Benzol wurde 4mal je 2 Stunden mit konz. H_2SO_4 bei 14° gerührt, dann wurde mit Wasser und 50-proz. KOH gewaschen, über Na getrocknet und über Na destilliert.

Chloroform mit 1% Alkoholgehalt wurde frisch destilliert, es war frei von Säure.

Vorbereitung der Lösungsmittel: Das Lösungsmittel, Benzol-Chloroform-Gemisch oder reines Chloroform, wurde mit ca. 5% Formamid geschüttelt und bis zur Klärung im Scheidetrichter stehengelassen. Das mit Formamid gesättigte Lösungsmittel wurde sofort verwendet. Bei Versuchen, die 24 Stunden dauerten, wurde der Trog durch einen Tropftrichter nachgefüllt.

m-Dinitrobenzol-Lösung: 10-proz. Lösung in Benzol.

Wässrig-methanolische Natronlauge: 6 g NaOH in 25 cm³ Wasser gelöst, mit 45 cm³ Methanol verdünnt.

Papier: Filterpapier *Whatman* Nr. 1 wurde in Bahnen von 45 cm Länge und einer dem Trog angepassten Breite (meistens 8 cm) geschnitten. 8 cm vom einen Ende wurde mit Bleistift die Startlinie und darauf die Nummern markiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde es durch Eintauchen mit Formamid getränkt und der Überschuss durch Auspressen mit einer Gummirolle zwischen 4 Lagen gewöhnlichen Filterpapiers entfernt. Es enthieilt dann ungefähr 11 mg Formamid pro cm².

¹⁾ Aus *Strophanthus intermedium*, siehe spätere Mitteilung.

²⁾ J. v. Euw, A. Katz, J. Schmutz & T. Reichstein, „Festschrift Prof. Paul Casparis“, S. 178, Zürich 1949; A. Buzas, J. v. Euw & T. Reichstein, Helv. 33, 465 (1950).

Extraktion der Samen.

Beispiel 1: 12 Samen von *Strophanthus sarmentosus P. DC.* (aus Togo, Probe *Walkowiak*¹⁾) (= 240 mg) wurden mit der Schere in ca. 1 mm lange Stücke zerschnitten, 10mal mit je 5 cm³ Petroläther entfettet und anschliessend im Vakuum getrocknet. Dann wurde mit 0,6 cm³ Wasser angerührt, mit 4 cm³ Äthanol versetzt, kurz aufgekocht und durch ein mit etwas Kieselgur (Celite Nr. 535²⁾) gedichtetes Filter abgenutscht. Der Rückstand wurde noch 6mal mit je 4 cm³ 60-proz. Alkohol heiss ausgezogen. Der nunmehr verbliebene Rückstand wurde mit 4 cm³ 60-proz. Äthanol im Mörser gut verrieben und das pulvige Material noch 2mal mit je 4 cm³ 60-proz. Äthanol heiss extrahiert. Die letzten 2 Auszüge und der Rückstand waren hierauf nicht mehr bitter. Die vereinigten Filtrate wurden mit dem frisch aus 0,3 g Bleidiacetat-trihydrat bereiteten und mit destilliertem Wasser gut gewaschenen Pb(OH)₂ versetzt und 5 Minuten energisch geschüttelt. Dann wurde durch ein mit Kieselgur (*Hyflo-Super-Cel*²⁾) gedichtetes Filter abgenutscht und 2mal mit je 4 cm³ 60-proz. Alkohol nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit einer Spur Säure bis zur eben lackmussauren Reaktion (pH = 5—6) versetzt und im Vakuum auf 11 cm³ eingeengt. Dann wurde mit 2-n. H₂SO₄ bis auf pH 4 angesäuert, 7mal mit je 10 cm³ Chloroform-Alkohol-(2:1)-Gemisch³⁾ ausgeschüttelt, die Auszüge über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (16 mg) wurde in 1 cm³ Methanol gelöst, mit 1 cm³ 0,1-n. H₂SO₄ versetzt und 25 Minuten unter Rückfluss gekocht. Dann wurde das Methanol im Vakuum entfernt und die wässrige Suspension 30 Minuten auf 50° erwärmt. Dann wurde 4mal mit je 2 cm³ Chloroform ausgeschüttelt, mit KHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es wurden so 7 mg Rückstand erhalten. Diese wurden in 2 cm³ 80-proz. Methanol gelöst und 3mal mit je 3 cm³ Petroläther ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden der Reihe nach einmal mit 1 cm³ 80-proz. Methanol nachgewaschen. Die vereinigten wässrig-methanolischen Auszüge wurden im Vakuum vom Methanol befreit, mit 1 cm³ Wasser verdünnt und 4mal mit je 2 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Die über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge hinterliessen beim Eindampfen 2 mg Rückstand. Dieser wurde in 0,03 cm³ Äthanol gelöst und aliquote Teile davon zur Chromatographie verwendet. Siehe Figur IVa.

Beispiel 2: 1 Samen derselben Art (= 20 mg) wurde genau wie oben extrahiert, nur dass jeweils nur 1/4 der oben genannten Lösungsmittelmengen verwendet wurde. Erhalten wurde ca. 0,1 mg Rückstand, der zur Chromatographie diente. Resultat siehe Figur IV.

Chromatographie.

0,03 mg Substanz⁴⁾ in 0,005 cm³ Äthanol gelöst, wurden auf den numerierten Punkt der Startlinie des frisch präparierten Papiers aufgetragen. Der Startfleck soll kreisrund und möglichst klein sein (nicht über 1 cm Durchmesser)⁵⁾. Weitere Substanzen wurden analog in Abständen von 1,5—2 cm aufgebracht. Bei Papierbahnen von 8 cm Breite wurden meistens 3 Präparate gleichzeitig laufen gelassen.

Die präparierten Papierstreifen wurden dann in einen Trog gehängt, der das durch Schütteln mit Formamid gesättigte Lösungsmittel enthielt und absteigend chromatographiert. Das Ganze befand sich in einem Gefäss, dessen Atmosphäre durch Einstellen von Schalen, die die beiden Lösungsmittel enthielten, mit Lösungsmittel- und Formamiddampf gesättigt war. Raumtemperatur 15°. Bei länger als 15 Stunden dauernden Ver-

¹⁾ Vgl. A. Buzas, J. v. Euw und T. Reichstein, Helv. **33**, 465 (1950).

²⁾ Produkt der Johns-Manville International Corporation, New York, bezogen von der Fa. Schneider & Co., Winterthur.

³⁾ Verhältnis der Volumina.

⁴⁾ Bei Rohextrakten wurden meistens 0,1—0,5 mg verwendet. Bei kristallisierten Substanzen genügen auch schon 0,005 mg.

⁵⁾ Bei verdünnteren Lösungen kann man auch mehrmals kleine Mengen auftragen und jeweils trocknen lassen, um den Fleck klein zu halten.

suchen wurde der Trog durch einen Tropftrichter dauernd nachgefüllt. Nach 24 Stunden oder nach der in der Tabelle I angegebenen Zeit wurden die Papierstreifen herausgenommen und während 5—10 Minuten im Trockenschrank bei ca. 60° vom Lösungsmittel befreit. Das Formamid-feuchte Papier wurde hierauf mit einer Druckspritzflasche mit der benzolischen Lösung von m-Dinitrobenzol gleichmässig besprüht, erneut 5—10 Minuten bei 60° getrocknet und anschliessend die NaOH-Lösung in gleicher Weise aufgespritzt. Nach ca. 2 Minuten färbten sich die glykosid- resp. aglykonhaltigen Zonen zuerst violett und nach einer weiteren halben bis ganzen Minute blau. Die erhaltenen Flecken wurden sofort mit Farbstift bezeichnet, da sie im Laufe von 5—10 Minuten wieder verblassen. Der Abstand des ungefähren Mittelpunktes dieser meist kreisförmigen oder elliptischen Zonen vom Ausgangspunkt wurde gemessen und ergab den in Tabelle I aufgezeichneten Weg.

Zusammenfassung.

Die von *Zaffaroni* und Mitarb. (loc. cit.) angegebene Methode zur Chromatographie von Steroiden auf mit Formamid imprägniertem Filterpapier wurde so modifiziert, dass es möglich ist, digitaloide Glykoside und Aglykone papierchromatographisch zu trennen und nachzuweisen. Die Methode ist für die Reinheitsprüfung und die Prüfung auf Einheitlichkeit von Glykosiden und Aglykonen aus *Strophanthus*-Samen verwendet worden und ist auch geeignet, in sehr kleinen Mengen *Strophanthus*-Samen die darin enthaltenen Glykoside und Aglykone nachzuweisen und zu identifizieren.

Pharmazeutische Anstalt der Universität, Basel.

13. Synthese des Pentantriols-(1,3,5) und des Äthylenketals des Pentanon-(3)-diols-(1,5)

von M. Viscontini und C. Ebnöther.

(8. XII. 50.)

Vor kurzem berichteten *S. Olsen & G. Aksnes*¹⁾ über eine neue Synthese des Pentantriols-(1,3,5) (I). Das Interesse, das diese Substanz gegenwärtig besitzt, veranlasst auch uns, eine einfache Synthese des Pentantriols-(1,3,5) bekanntzugeben, die schon vor einiger Zeit in unserem Laboratorium ausgeführt wurde und mit guter Ausbeute zur reinen Verbindung führte.

Zum ersten Male wurde Pentantriol-(1,3,5) von *Blanchard & Paul*²⁾ beschrieben, die von 4-Oxy-tetrahydro-pyran ausgegangen sind und nur mit Schwierigkeiten die gesuchte Substanz erhielten.

¹⁾ *S. Olsen & G. Aksnes*, Acta Chem. Scand. **4**, 993 (1950).

²⁾ *L. Blanchard & R. Paul*, C. r. **200**, 1414 (1935).