

177. Trennung und Bestimmung herzwirksamer Glykoside und deren Aglykone durch Chromatographie an Silicagel.

27. Mitteilung über Herzglykoside¹⁾

von A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuss, W. Kussmaul und J. Renz.

(9. VI. 51.)

1. Einleitung.

Die Digitalisglykoside und die ihnen nahe stehenden Digitaloide bilden eine Gruppe von herzwirksamen Naturstoffen, die neben ihrer chemischen Verwandtschaft auch ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Sie besitzen keine basischen und keine sauren Gruppen; gegenüber chemischen Agenzien, besonders gegenüber Säuren und Laugen sind sie indessen empfindlich. Die Isolierung von einheitlichen Herzglykosiden aus den Drogen geschieht daher meist mit rein physikalischen Methoden und gestaltet sich besonders dann schwierig, wenn mehrere nahe verwandte Glykoside in einer Droge miteinander vergesellschaftet sind, was oft der Fall ist. Neben der Abtrennung von unerwünschten Begleitstoffen und der Aufteilung von komplizierten Gemischen in ihre einheitlichen Komponenten handelt es sich gelegentlich auch darum, die Einheitlichkeit von sogenannten Reinglykosidpräparaten, wie sie von den Arzneibüchern gefordert wird, unter Beweis zu stellen. Es sind daher schon seit langem und besonders in der letzten Zeit grosse Anstrengungen gemacht worden, um einwandfreie Methoden zur Trennung, Identifizierung und Reinheitsprüfung von herzwirksamen Glykosiden auszuarbeiten. Die ganz kürzlich erschienenen Arbeiten²⁾ z. B. zeigen, dass es mit Hilfe der Papierchromatographie gelingt, Digitalis- und Strophanthusglykoside wie auch deren Aglykone zu trennen und auf Einheitlichkeit zu prüfen.

Für die quantitative Bestimmung von reinen Glykosiden aus Digitalis- und Strophanthusdrogen und ihren Aglykonen sind mehrere kolorimetrische Methoden herangezogen worden. Entsprechende Vorschriften sind z. B. für die Farbreaktionen nach *Baljet*³⁾, *Keller-*

¹⁾ 26. Mitteilung, *Helv.* **34**, 1431 (1951).

²⁾ A. B. Svendsen & K. B. Jensen, *Pharm. Acta Helv.* **25**, 241 (1950); P. Mesnard & J. Derève, *B. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux* **88**, 109, 114 (1950); F. Jaminet, *J. Pharm. Belg.* **50**, 297 (1950); O. Schindler & T. Reichstein, *Helv.* **34**, 108 (1951); W. Lang, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **91**, 125 (1951).

³⁾ H. Baljet, *Schweiz. Apoth. Ztg.* **56**, 71, 84 (1918); A. Knudson & M. Dresbach, *J. Pharm. exp. Ther.* **20**, 205 (1922); W. Neumann, *Z. physiol. Chem.* **240**, 241 (1936); F. K. Bell & J. C. Krantz jr., *J. Am. Pharm. Ass.* **35**, 260 (1946); **37**, 297 (1948); **38**, 107 (1949); **39**, 319 (1950); S. W. Goldstein, *ibid.* **36**, 296 (1947); E. E. Kennedy, *ibid.* **39**, 25 (1950); F. Neuwald, *ibid.* **39**, 172 (1950).

*Kiliani*¹⁾, *Legal*²⁾, *Raymond*³⁾ und für einige andere⁴⁾ ausgearbeitet worden. In Gemischen können die einzelnen Komponenten damit allerdings nicht erkannt werden, da Farbreaktionen für die Glieder einer ganzen Gruppe von nahe verwandten Herzglykosiden gleich verlaufen. Zur Bestimmung der einzelnen Komponenten des Digitalids, des isomorph kristallisierten Gemisches aus Lanatosid A, B und C, ist die Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln benützt worden⁵⁾. Diese Methode gibt bei reinen, einfachen Gemischen von Stoffen, von welchen die Verteilungskoeffizienten zwischen den betreffenden Lösungsmitteln ermittelt sind, zuverlässige Werte, erfordert aber zur Durchführung relativ viel Substanz.

In der vorangehenden Mitteilung⁶⁾ wurde gezeigt, dass sich zur präparativen Darstellung einer Reihe von Glykosiden aus dem komplizierten Glykosidgemisch der weissen Meerzwiebel die Verteilungs-chromatographie an einer Säule aus einer speziellen Sorte von mit Wasser gesättigter Kieselgur (sog. Diatomitstein) gut bewährt. Für analytische Zwecke war der Aufwand an Material und Lösungsmitteln allerdings zu gross, so dass wir nach einem geeigneteren Material Umschau hielten. Inzwischen haben vor allem amerikanische Forscher Silicagel mit Erfolg für verschiedene Trennungen (von acetylierten⁷⁾ und freien Aminosäuren⁸⁾, Antibiotica⁹⁾, methylierten Zuckern¹⁰⁾, organischen Säuren¹¹⁾, Alkaloiden¹²⁾ u. a.) angewandt. In

¹⁾ *A. E. James, F. O. Laquer & J. D. McIntyre*, J. Am. Pharm. Ass. **36**, 1 (1947); *E. Soos*, Scientia Pharmaceutica **16**, 1, 29 (1948); *B. E. Lindewald & I. Petrell*, Farm. Notisbl. **59**, 187 (1950).

²⁾ *D. L. Kedde*, Diss. Leiden 1946, vgl. Pharm. Tijdschr. **1947**, 169.

³⁾ *W. D. Raymond*, Analyst **63**, 478 (1938); **64**, 113 (1939); *S. K. Rasmussen*, Dansk Tidsskr. Farm. **18**, 48 (1944); *R. C. Anderson & K. K. Chen*, J. Am. Pharm. Ass. **35**, 353 (1946); *T. Canbäck*, Svensk farm. Tidskr. **54**, 201 (1950).

⁴⁾ *D. L. Kedde*, Diss. Leiden 1946 (mit Natrium-3,5-dinitrobenzoat); *A. T. Warren, F. O. Howland & L. W. Green*, J. Am. Pharm. Ass. **37**, 186 (1948) (mit Natrium- β -naphthochinon-4-sulfonat); *T. Canbäck*, J. Pharm. Pharmacol. **1**, 201 (1949); *P. Bellet*, Ann. pharm. franç. **8**, 471 (1950).

⁵⁾ *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **16**, 1049 (1933).

⁶⁾ *A. Stoll & W. Kreis*, Helv. **34**, 1431 (1951).

⁷⁾ *A. J. P. Martin & R. L. M. Synge*, Biochem. J. **35**, 91, 1358 (1941); *A. J. P. Martin*, Annual Reports **45**, 276 (1948).

⁸⁾ *G. R. Tristram*, Biochem. J. **40**, 721 (1946).

⁹⁾ *J. R. Catch, A. H. Cook & I. M. Heilbron*, Nature **150**, 633 (1942); *M. T. Bush, A. Goth & H. L. Dickison*, J. Pharm. exp. Ther. **84**, 262 (1945); *H. Fischbach, T. E. Eble & M. Mundell*, J. Am. Pharm. Ass. **36**, 220 (1947); *W. R. Boon, C. T. Calam, H. Gudgeon & A. A. Levi*, Biochem. J. **43**, 262 (1948).

¹⁰⁾ *D. J. Bell*, Soc. **1944**, 473.

¹¹⁾ *L. L. Ramsey & W. I. Patterson*, J. Ass. Off. Agr. Chem. **28**, 644 (1945); **31**, 139 (1948); *S. R. Elsdén*, Biochem. J. **40**, 252 (1946); *J. Exp. Biol.* **22**, 51 (1946); *W. E. Hanby & H. N. Rydon*, Biochem. J. **40**, 297 (1946); *F. A. Isherwood*, Biochem. J. **40**, 688 (1946); *L. M. Marshall, J. M. Orton & A. H. Smith*, Science **108**, 92 (1948).

¹²⁾ *W. C. Evans & M. W. Partridge*, Quart. J. Pharm. Pharmacol. **21**, 126 (1948); *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 593 (1949); *A. J. Hennig, T. Higuchi & L. M. Parks*, J. Am. Pharm. Ass. **40**, 168 (1951).

zahlreichen Versuchen konnten wir feststellen, dass Silicagel auch für die Aufteilung von Herzglykosidgemischen in ihre einheitlichen Komponenten geeignet ist und berichten im folgenden über unsere Erfahrungen.

Das bei diesen Untersuchungen verwendete Silicagel haben wir aus technischem Wasserglas durch Fällern mit Salzsäure und Trocknen bei 100—120° hergestellt. Ein solches Präparat nimmt mehr als sein eigenes Gewicht an Wasser ohne zusammenzubacken wieder auf. Für die verschiedenen Trennungen wurde das Silicagel entweder vollständig oder nur teilweise mit Wasser gesättigt, mitunter aber auch ganz trocken angewandt¹⁾. Durch diese Variationsmöglichkeit können verschiedene Trenneffekte erzielt werden. Bei mit Wasser gesättigtem Silicagel wird die Verteilungschromatographie im Vordergrund stehen, während bei Verwendung von trockenem Silicagel die Adsorptionsschromatographie eine Rolle spielt. Zwischen diesen beiden Extremen werden bei mehr oder weniger wasserhaltigen Silicagelen wahrscheinlich diese beiden und noch andere Effekte bei der Aufteilung von Substanzgemischen²⁾ zusammenwirken.

Als mobile Phase hat sich bei unsern Säulenversuchen entweder ganz trockener oder dann wassergesättigter Essigester mit Zusätzen bis zu 5% Methanol und in einigen Fällen auch Chloroform mit einem Gehalt bis zu 5% Methanol bewährt. Der verschiedene Wassergehalt des Silicagels und die Auswahl der Lösungsmittel bietet eine grosse Variationsmöglichkeit, die den Eigenschaften der zu trennenden Glykoside oder Aglykone angepasst werden kann.

Bei Einhaltung standardisierter Bedingungen sind die von den einzelnen Glykosiden in der Säule zurückgelegten Strecken relativ konstant, d. h. ein bestimmtes Glykosid wird immer in den gleichen Fraktionen angetroffen. Für Identitätsprüfungen wird man daher die reine Vergleichssubstanz unter den gleichen Bedingungen chromatographieren. Zur Trennung von komplizierten Gemischen reicht eine einzige Säule oft nicht aus. In diesem Fall wird man in einem ersten Versuch das Gemisch grob aufteilen und in einer folgenden Säule unter veränderten Bedingungen (Silicagel mit anderem Wassergehalt, andere Lösungsmittel) die einzelnen Fraktionen weiter auseinanderziehen.

Im folgenden werden wir an verschiedenen Beispielen zeigen, wie diese Methode zur quantitativen Trennung von herzwirksamen Glykosiden und Aglykonen und zu deren Identifizierung und Reinheitsprüfung angewandt werden kann. Die experimentellen Einzel-

¹⁾ Vgl. auch *H. Bretschneider*, Sitzungsber. Akad. Wissensch. Wien, Abt. II b, **150**, 129 (1941).

²⁾ Vgl. hierzu auch *P. Decker & W. Riffart*, Chem. Ztg. **74**, 261, 273 (1950); *H. R. Bentley & J. K. Whitehead*, Biochem. J. **46**, 341 (1950); *Chevallier & Dubouloz*, Referat in Chem. Ztg. **74**, 122 (1950).

heiten, wie z. B. die Herstellung des Silicagels und die Ausführung der Chromatographie, werden im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben.

2. Trennung und Prüfung von Scillaglykosiden.

Recht instruktiv ist das Verhalten von vier reinen, kristallisierten Glykosiden aus der weissen Meerzwiebel, nämlich Proscillaridin A, Scillaren A, Scilliglaukosid und Scillicyanosid¹⁾ an einem wassergesättigten Silicagel.

Als mobile Phase diente wassergesättigter Essigester mit einem Gehalt von 0,5% Methanol. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Figur 1 graphisch zusammengestellt. Auf der Abszisse wird die gesamte Anzahl cm³ des abgelaufenen Lösungsmittels, auf der Ordinate der Gehalt von je 10 cm³ an Glykosid in mg, d. h. die Glykosidkonzentration aufgetragen.

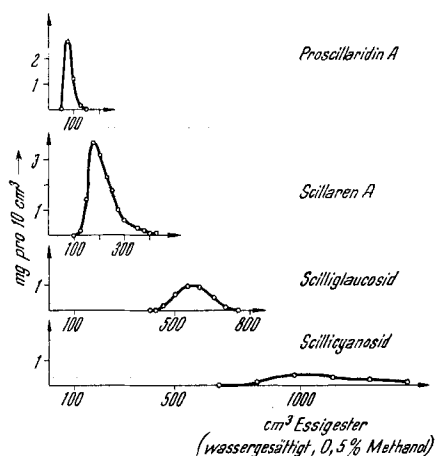


Fig. 1.

Prüfung von Proscillaridin A, Scillaren A, Scilliglaukosid und Scillicyanosid an wassergesättigtem Silicagel.

Glykosid	Eingewogen mg	Gefunden mg
Proscillaridin A . .	10,0	10,4
Scillaren A	40,0	41,4
Scilliglaukosid . .	15,0	15,8
Scillicyanosid . .	15,0	15,2

Während Proscillaridin A sehr schnell durchläuft, so dass schon nach 150 cm³ das Lösungsmittel glykosidfrei abläuft, so erscheint Scillaren A erst nachdem bereits 120 cm³ Lösungsmittel abgelaufen sind. Die Zone, in der sich die beiden Kurven überdecken, ist nur sehr schmal. Viel später (nach 420 cm³) erscheint Scilliglaukosid, und erst wenn 700 cm³ Lösungsmittel abgelaufen sind Scillicyanosid.

¹⁾ A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **34**, 1431 (1951).

Diese Verhältnisse entsprechen fast einem Idealfall, indem es gelingt, ein aus 4 Glykosiden bestehendes Gemisch mit einer Säule und einem Lösungsmittel in seine 4 praktisch einheitlichen Komponenten aufzuteilen. Ein künstliches Gemisch dieser 4 Glykoside ergab denn auch das in Figur 2 dargestellte Bild. Wie erwartet,

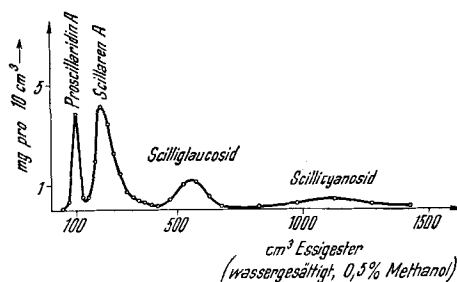


Fig. 2.

Trennung eines künstlichen Glykosidgemisches
an wassergesättigtem Silicagel.

Glykosid	Eingewogen mg	Gefunden mg
Proscillaridin A . .	10,0	11,6
Scillaren A	40,0	40,6
Scilliglaucosid . .	15,0	15,8
Scillicyanosid . .	15,0	13,2
Total .	80,0	81,2

findet tatsächlich eine Trennung dieser 4 Komponenten statt; die Konzentrationsmaxima der einzelnen Glykoside liegen bei dem Gemisch an den gleichen Stellen wie in Figur 1. Es findet demnach keine wesentliche gegenseitige Beeinflussung der Komponenten statt, und die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Stoffe verläuft weitgehend unabhängig von den Begleitsubstanzen. Die einzelnen Fraktionen unterscheiden sich voneinander scharf in der *Liebermann'schen* Farbreaktion¹⁾; die wiedergefundenen Mengen entsprechen ziemlich genau den Einwägen der einzelnen Glykoside.

Ein gereinigtes Gesamtglykosidpräparat aus der weissen Meerzwiebel ergibt, wie aus der Darstellung in Figur 3 hervorgeht, unter den oben angewandten Bedingungen keine so scharfe Trennung, da neben den in Figur 1 und 2 erwähnten wichtigsten Glykosiden noch mehrere andere im natürlichen Glykosidgemisch enthalten sind, die in der Säule zwischen den 4 genannten Glykosiden wandern.

Weitere Glykoside, die z. T. schon in der vorangehenden Arbeit¹⁾ beschrieben worden sind, lassen sich gut nachweisen, wenn man die

¹⁾ A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **34**, 1431 (1951).

einzelnen Fraktionen des Säulenversuches auf ihr Verhalten bei der *Liebermann'schen* Farbreaktion prüft.

Bei einem so komplizierten Gemisch, wie es im Gesamtglykosidpräparat der weissen Meerzwiebel vorliegt, besteht die Möglichkeit, durch Variation der Versuchsbedingungen, beispielsweise durch Verwendung eines nicht ganz wassergesättigten Silicagels oder durch Anwendung von grösseren Säulen (vgl. experimentellen Teil), einzelne Bereiche der in Figur 3 dargestellten Elutionen so weit auseinanderzuziehen, dass auch die nur in geringer Menge anwesenden Glykoside wenigstens zum Teil erfasst werden können. Wie aus Figur 3 hervorgeht, konnten von den eingewogenen 100 mg Substanz nur 85 mg mit 1400 cm³ Essigester eluiert werden. Der in der Säule verbleibende Rest von 15% besteht aus einer Reihe von weiteren Glykosiden, die in der voranstehenden Arbeit z. T. bereits beschrieben worden sind.

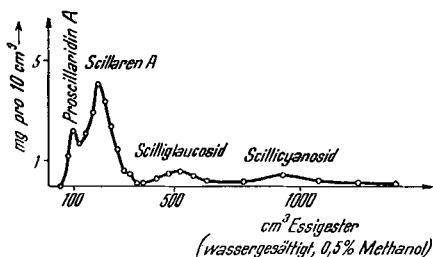


Fig. 3.

Aufteilung eines Glykosidkomplexes aus der weissen Meerzwiebel an wassergesättigtem Silicagel.

Eingewogen: 100 mg

Gefunden (bis 1400 cm³): 85,2 mg.

Wie schon erwähnt, lassen sich mit der wassergesättigten Säule nicht alle Glykoside voneinander trennen, z. B. auch das Proscillaridin A nicht von seinem Anhydro-Aglykon, dem Scillaridin A. Wird aber an Stelle von wassergesättigtem Silicagel trockenes Material verwendet, so gelingt die Trennung dieser beiden Stoffe, wie aus der Figur 4 hervorgeht.

Durch die Verwendung von trockenem Essigester oder von Chloroform als Lösungsmittel könnten die beiden Maxima noch weiter auseinandergezogen werden.

Das Hauptglykosid der roten Meerzwiebel, das Scillirosid¹⁾ lässt sich mit der wassergesättigten Silicagelsäule bestimmen (Fig. 5).

Sein Konzentrationsmaximum liegt zwischen demjenigen von Scillaren A und Scilliglaucosid. Ein Gemisch von Proscillaridin A, Scillaren A, Scillirosid und Scilliglaucosid kann demnach in die Kom-

¹⁾ A. Stoll & J. Renz, *Helv.* **25**, 43 (1941).

ponenten aufgeteilt werden, wie das Ergebnis mit einem künstlichen Gemisch in Figur 6 zeigt. Die rote Meerzwiebel liefert ein ähnliches Gemisch, wie die Aufteilung eines gereinigten Gesamtglykosidpräparates aus einer nordafrikanischen Droge in Figur 7 ergibt.

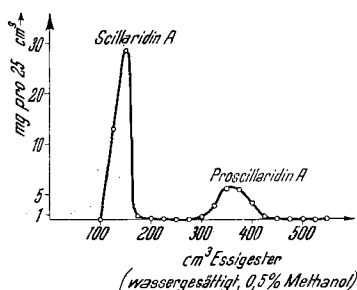


Fig. 4.

Trennung eines Gemisches von Scillaridin A und Proscillaridin A an trockenem Silicagel.

Scillaridin A: Eingewogen: 21,9 mg
Gefunden: 21,2 mg

Proscillaridin A: Eingewogen: 51,8 mg
Gefunden: 52,9 mg

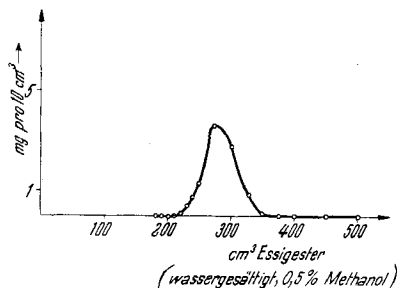


Fig. 5.

Prüfung von Scillirosid an wassergesättigtem Silicagel.

Eingewogen: 19,4 mg
Gefunden: 20,7 mg

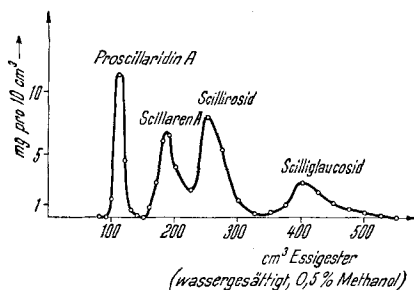


Fig. 6.

Trennung eines künstlichen Glykosidgemisches an wassergesättigtem Silicagel.

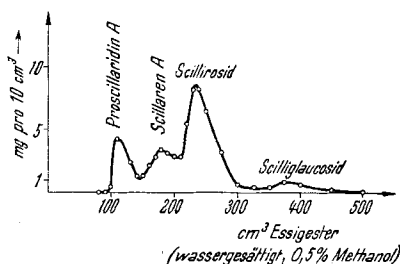


Fig. 7.

Aufteilung eines Glykosidkomplexes [aus roter Meerzwiebel] an wassergesättigtem Silicagel.

Glykosid	Eingewogen mg	Gefunden mg
Proscillaridin A	20,1	20,1
Scillaren A . . .	20,3	22,5
Scillirosid . . .	43,3	41,4
Scilliglaucosid .	20,4	18,1
Total	104,1	102,1

Auch hier ist wegen der Anwesenheit kleiner Mengen von Begleitglykosiden die Trennung nicht so scharf wie beim künstlich aus 4 reinen Komponenten zusammengesetzten Gemisch. Die Lage der Maxima und die *Liebermann*'schen Farbreaktionen sprechen jedoch eindeutig für die Anwesenheit der 4 erwähnten Glykoside.

3. Trennung und Prüfung von Digitalisglykosiden und -aglykonen.

Die Glykoside der *Digitalis lanata* bestehen zur Hauptsache aus den 3 Lanatosiden (Digilaniden) A, B und C¹⁾, die, wie erwähnt, isomorph kristallisieren und durch Umkristallisieren nicht voneinander getrennt werden können. An einer wassergesättigten Silicagelsäule lassen sich mit Hilfe von wassergesättigtem, 0,5% methanolhaltigem Essigester sowohl die einzelnen Komponenten bequem bestimmen (Fig. 8) als auch ein Digilanidgesamtpräparat mit einer

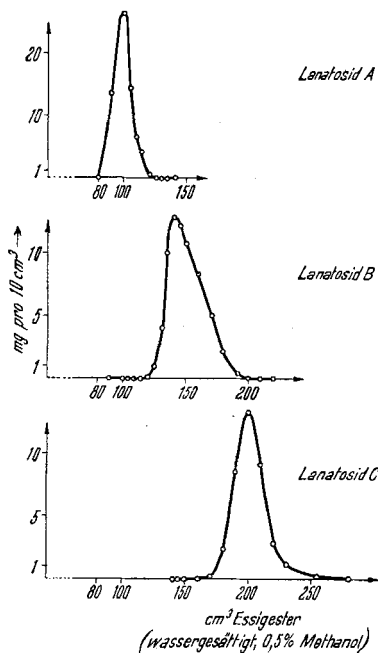


Fig. 8.

Prüfung der Lanatoside A, B und C an wassergesättigtem Silicagel.

Glykosid	Eingewogen mg	Gefunden mg
Lanatosid A . . .	54,3	53,6
Lanatosid B . . .	42,8	41,4
Lanatosid C . . .	50,2	49,3

¹⁾ A. Stoll & W. Kreis, Helv. **16**, 1049 (1933).

Genauigkeit von $\pm 3\%$ in die einzelnen Komponenten aufteilen (Fig. 9).

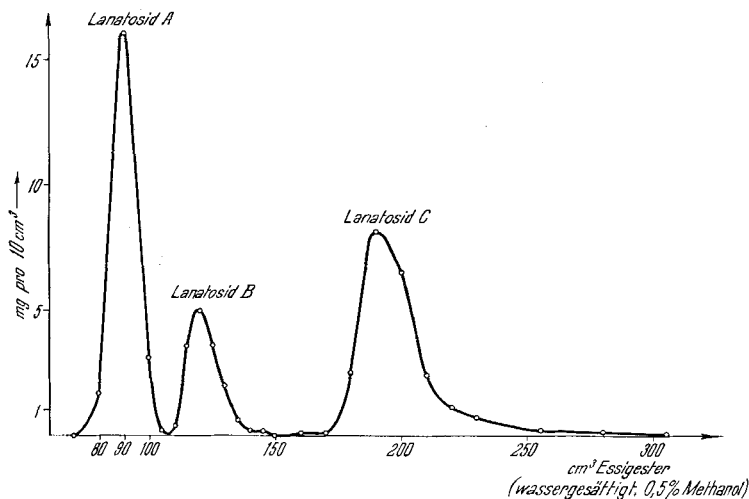


Fig. 9.

Trennung eines Gemisches von Lanatosid A, B und C an wassergesättigtem Silicagel.

Eingewogen: 55,7 mg Gesamtdigilanid	Gefunden: 24,5 mg Lanatosid A, 45%
	8,0 mg Lanatosid B, 15%
	22,1 mg Lanatosid C, 40%
	Total 54,6 mg

Während es bei den Scillaglykosiden im allgemeinen belanglos ist, ob die Substanz in fester Form oder gelöst auf die Säule gebracht wird, ist es bei den Digitalisglykosiden vorteilhaft, wenn die Präparate in gelöstem Zustand auf die Säule gegeben werden. Im Eluierungsmittel selbst sind Digitalisglykoside z. T. zu wenig löslich, so dass eine möglichst konzentrierte Lösung von davon in Methanol, Chloroform, Pyridin oder in einem Gemisch dieser Lösungsmittel auf die Säule gegossen wird. Unter diesen Bedingungen lassen sich alle bekannten Abkömmlinge der 3 genuinen Lanataglykoside, also die Desacetyl lanatoside A und B (Purpureaglykoside A und B), ferner Desacetyl lanatosid C, Digitoxin, Gitoxin und Digoxin, Acetyldigitoxin, Acetyl gitoxin und Acetyl digoxin, mit der Säule bestimmen. Zum Teil muss der Methanolgehalt des wassergesättigten Essigesters etwas erhöht werden, damit sich die Elution nicht über zu viele Fraktionen erstreckt. Dies ist besonders für die Glykoside der Desacetylstufe (Purpureaglykoside A und B, Desacetyl lanatosid C) von Vorteil.

Die Digitalisaglykone sowie die Glykoside der Digitoxinstufe (Digitoxin, Gitoxin und Digoxin) und der Acetyldigitoxinstufe (Acetyldigitoxin, Acetyl gitoxin und Acetyl digoxin) befinden sich

beim Passieren der wassergesättigten Silicagelsäule in den ersten Fraktionen. Ihre Konzentrationsmaxima fallen im grossen und ganzen mit demjenigen von Lanatosid A zusammen. Unter diesen Bedingungen sind auch die beiden Purpureaglykoside A und B, die genuinen Glykoside der *Digitalis purpurea*¹⁾, nicht einwandfrei von den Lanatosiden B und C der *Digitalis lanata* zu trennen. Es war deshalb notwendig, für gewisse Trennungen die einzelnen Maxima weiter auseinanderzulegen. Dies kann auf zwei Wegen erreicht werden: 1. Durch Verwendung von mehr Silicagel, d. h. durch grössere und besonders höhere Säulen, oder 2. durch Variation des Wassergehalts des Silicagels. Wir haben im allgemeinen den letzteren Weg gewählt.

Um den Einfluss des Wassergehalts zu illustrieren, haben wir in Figur 10 das gleiche Substanzgemisch, bestehend aus Digitoxin, Gitoxin, Lanatosid A, Lanatosid B, Purpureaglykosid A und Purpureaglykosid B in 4 Versuchen am gleichen Silicagel, aber mit verschiedenem Wassergehalt chromatographiert.

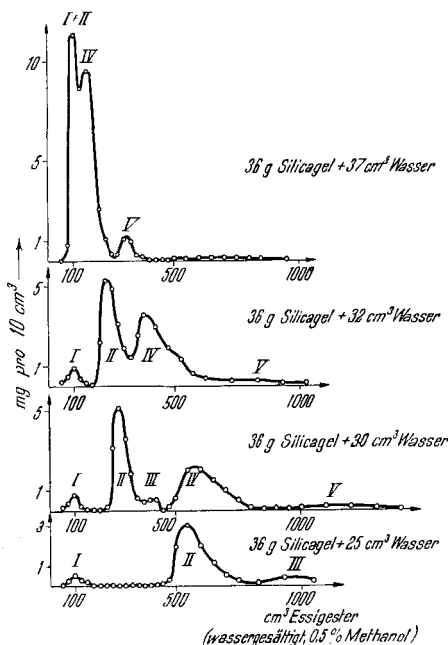


Fig. 10.

Aufteilung eines künstlichen Digitalisglykosid-Präparates an Silicagel mit verschiedenem Wassergehalt.

- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| I = Digitoxin und Gitoxin | IV = Desacetyl-lanatosid A |
| II = Lanatosid A | V = Desacetyl-lanatosid B |
| III = Lanatosid B | |

¹⁾ A. Stoll & W. Kreis, *Helv.* **16**, 1390 (1933).

Zum Vergleich haben wir ein USP-Digitoxin-Standardpräparat geprüft. Das Ergebnis dieser Prüfung ist in Fig. 12 wiedergegeben.

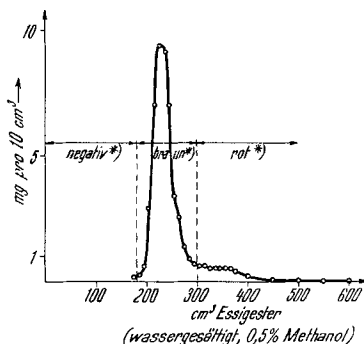


Fig. 12.

Prüfung von U.S.P.-Digitoxin Reference Standard an trockenem Silicagel.

Eingewogen: 51,2 mg Gefunden total: 51,3 mg

*) Farbreaktion nach Keller-Kiliani.

Hier zeigen die Fraktionen zwischen 300 und 500 cm³ bei der Keller-Kiliani'schen Farbreaktion die für Gitoxin charakteristische karminrote Zone, womit auch die Lage dieser Fraktionen im Chromatogramm übereinstimmt. Mit Hilfe der Silicagelsäule gelingt es also, in Digitoxinpräparaten auch kleine Mengen von Begleitglykosiden nachzuweisen.

In drei weiteren Beispielen zeigen wir die Trennung von Acetyl-digitoxin und Digitoxin (Fig. 13), des Aglykons Digitoxigenin vom Acetyldigitoxin- α (Fig. 14) und des Acetyldigoxin- α vom Digoxin (Fig. 15). Alle drei Versuche wurden mit trockenem Silicagel und wasserfreiem Lösungsmittel ausgeführt.

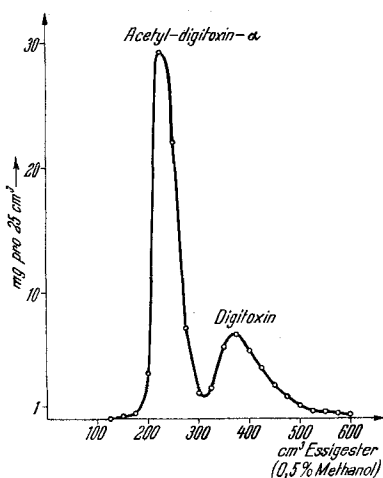


Fig. 13.

Trennung eines Gemisches von Acetyl-digitoxin- α und Digitoxin an trockenem Silicagel.

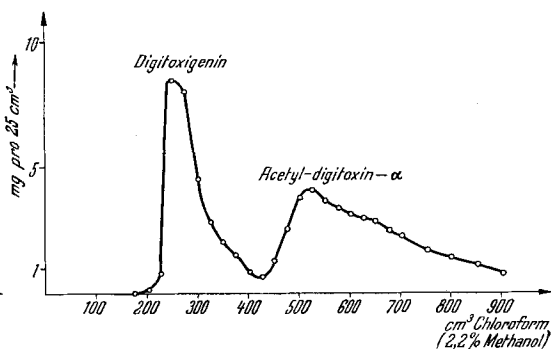


Fig. 14.

Trennung eines Gemisches von Digitoxigenin und Acetyl-digitoxin- α an trockenem Silicagel.

Trotz Variation der Bedingungen gelang es uns bisher noch nicht, das Digoxigenin vom Acetyldigoxin- α zu trennen; diese beiden Substanzen, die sich vom Lanatosid C ableiten, zeigten in der Säule stets die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit.

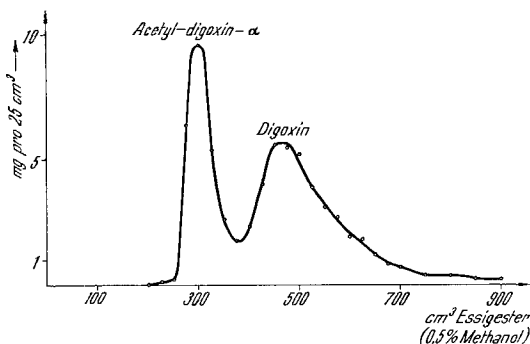


Fig. 15.

Trennung eines Gemisches von Acetyl-digoxin- α und Digoxin an trockenem Silicagel.

Vom Acetyldigoxin und vom Acetyldigitoxin sind zwei Isomere, die sog. α - und β -Formen¹⁾ beschrieben worden. Diese Isomerie hängt offensichtlich mit der Acetylgruppe zusammen und äussert sich in verschiedenen Kristallformen, Schmelzpunkten und Drehwerten. Auch bei der Trennung dieser beiden Isomeren hat die Silicagelsäule bisher versagt. Sie leistet dagegen wiederum gute Dienste bei der Trennung verschiedener Digitalisaglykone, so z. B. bei der Aufteilung eines Gemisches von Digitoxigenin und Digoxigenin, wie sie in Figur 16 schön zum Ausdruck kommt.

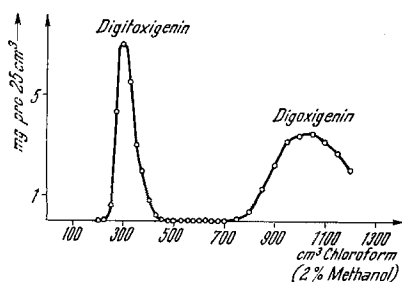


Fig. 16.

Trennung eines Gemisches von Digitoxigenin und Digoxigenin an trockenem Silicagel.

Auch die vom Gitoxigenin durch Acetylierung und Wasserabspaltung sich ableitenden Verbindungen können in einer trockenen Silicagelsäule voneinander getrennt und bestimmt werden. So haben

¹⁾ A. Stoll & W. Kreis, Helv. **17**, 592 (1934).

wir beispielsweise ein Präparat, das wir nach saurer Hydrolyse einer aus der *Digitalis lanata* stammenden acetylierten Glykosidmutterlauge erhielten, und das sich bei der *Keller-Kiliani'schen* Farb-reaktion durch eine Rotzone kennzeichnete, untersucht (Fig. 17) und dabei Fraktionen erhalten, die sich mit 14,16-Dianhydrogitoxigenin¹⁾, Oleandrigenin (= 16-Acetylgitoxigenin)²⁾ und Gitoxigenin identifizieren liessen.

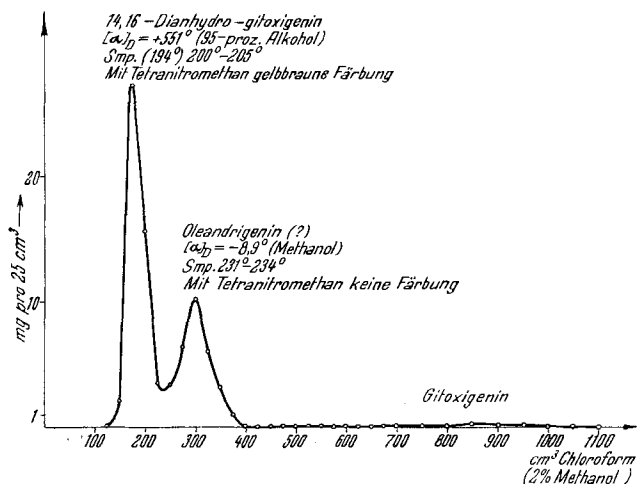


Fig. 17.

Untersuchung eines Hydrolysenproduktes einer acetylierten Gitoxigenin-Glykosid-Fraktion aus *Digitalis lanata* an trockenem Silicagel.

Wahrscheinlich sind diese zuckerfreien Verbindungen zum Teil sekundäre Produkte, die bei der sauren Hydrolyse eines acetylierten Gitoxigeninglykosids entstanden sind. Das Beispiel zeigt immerhin, dass sich die Silicagelsäule auch zur Trennung von Abbau- und Umwandlungsprodukten von herzwirksamen Glykosiden eignen kann.

4. Trennung von Strophanthusglykosiden.

Von den drei wichtigsten Glykosiden des *Strophanthus* kombé lässt sich das Cymarin in einer Säule aus wassergesättigtem Silicagel von den beiden andern Glykosiden, dem k-Strophanthin- β und dem k-Strophanthosid³⁾ abtrennen (s. Fig. 18).

¹⁾ Für 14,16-Dianhydrogitoxigenin fand *H. Kiliani*, B. **53**, 240 (1920), eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = +454^\circ$ (in 95-proz. Alkohol). Vgl. auch *K. Meyer*, Helv. **32**, 1999 (1949). Bei unserer Spitzenfraktion liegt der spezifische Drehwert bei $+551^\circ$ (in Alkohol).

²⁾ Für Oleandrigenin fand *W. Neumann*, B. **70**, 1547 (1937), einen Smp. von ca. 223° und eine Drehung von $[\alpha]_D^{18} = -8,5^\circ$ (in Methanol). *A. Hunger* & *T. Reichstein*, Helv. **33**, 91 (1950), fanden Smp. 225–228°; $[\alpha]_D^{18} = -9,8^\circ$ (in Methanol).

³⁾ *A. Stoll*, *J. Renz* & *W. Kreis*, Helv. **20**, 1484 (1937).

Die beiden letzteren, in Wasser leicht löslichen Glykoside werden unter diesen Bedingungen nicht aus der Säule herausgelöst. Dieser Versuch hat keine praktische Bedeutung, da das Cymar in auch durch Ausschütteln z. B. mit Chloroform aus wässriger Lösung einfach und quantitativ von k-Strophanthin- β und k-Strophanthosid abgetrennt werden kann.

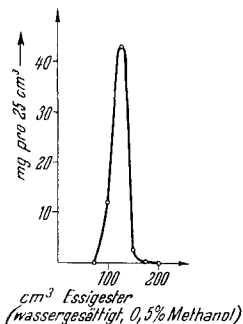


Fig. 18.

Untersuchung von Cymar in an wassergesättigtem Silicagel.
Eingewogen: 56,6 mg Gefunden: 58,3 mg

Die Silicagelsäule scheint also unter den hier besprochenen Bedingungen zur Trennung von leicht wasserlöslichen Glykosiden nicht geeignet zu sein. Das Beispiel des Cymar ins, das aus den leicht wasserlöslichen Glykosiden durch enzymatische Abspaltung von Glucoseresten entsteht und aus der Säule gut eluiert wird, gibt indessen einen Fingerzeig dafür, dass die Silicagelsäule zur Trennung von anderen Glykosiden der Cymar instufe (z. B. Periplocymar in, Emicymar in, Sarmentocymar in) unter Variation des Wassergehaltes geeignet sein dürfte.

Andererseits besteht die Möglichkeit, auch die leicht wasserlöslichen, zuckerreichen Glykoside mit der Silicagelsäule voneinander zu trennen, darin, dass sie in ihre in Wasser fast unlöslichen Acetyl-derivate übergeführt, und dass diese in der Säule getrennt werden. In Figur 19 ist das Verhalten von Heptacetyl-k-strophanthosid wiedergegeben, das mit Chloroform + 2% Methanol quantitativ aus der Säule eluiert wird. Die Figur 20 zeigt die Trennung von Acetylcymar in und Heptacetyl-k-strophanthosid, wobei in den 3 Versuchen lediglich der Methanolgehalt des eluierenden Chloroforms ganz wenig variiert wurde.

Aus diesen Versuchen geht eindeutig hervor, dass minimale Änderungen im Methanolgehalt der mobilen Phase den Trennungseffekt ganz erheblich beeinflussen können. Während mit einem Gehalt von 1,5% Methanol noch keine einwandfreie Trennung stattfindet, so ist bei einem Gehalt von 1,3% Methanol die Trennung bereits gut; bei 1,2% Methanol sind die beiden Maxima noch etwas weiter aus-

einandergezogen. Bei diesem Methanolgehalt ist die Kurve für das Heptacetyl-k-strophanthosid schon flach, d. h. die Verbindung wird langsam aus der Säule eluiert, was für praktische Zwecke ungeeignet ist. Die kaum wasserlöslichen acetylierten Glykoside sprechen in ihrem Verhalten in der Säule ganz besonders empfindlich auf so kleine Änderungen im Methanolgehalt an.

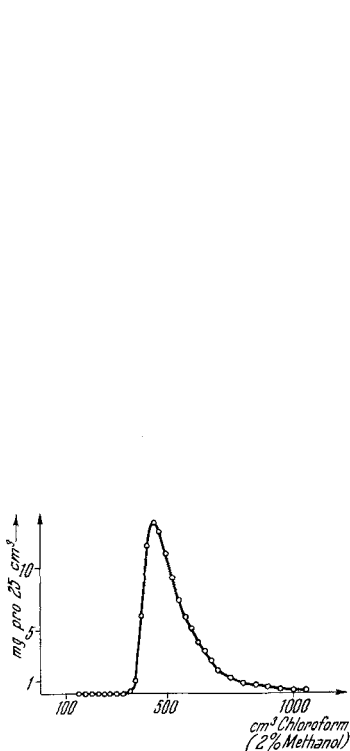


Fig. 19.

Prüfung von Heptacetyl-k-strophanthosid an trockenem Silicagel.

Eingewogen: 98,8 mg

Gefunden: 101,5 mg

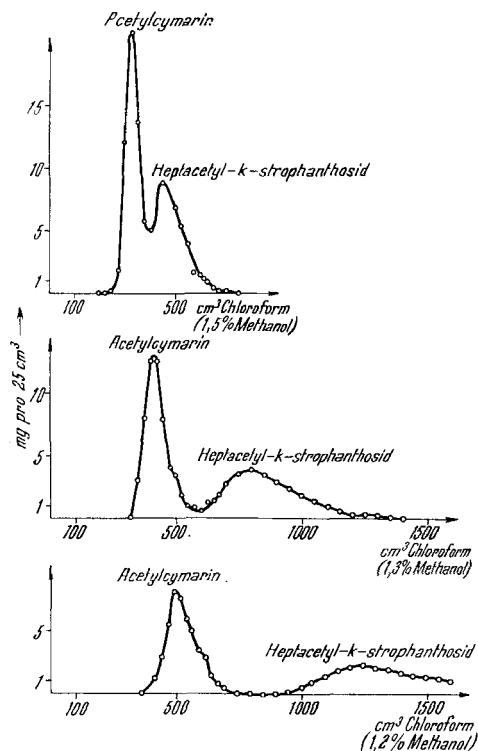


Fig. 20.

Aufteilung eines Gemisches von Acetylcymarin und Heptacetyl-k-strophanthosid an trockenem Silicagel.

Experimenteller Teil.

1. Herstellung des Silicagels. 1 Liter käufliches Wasserglas ($d = 1,35 - 1,40$) wird mit 2 Liter dest. Wasser verdünnt. Zu der durch Filtration geklärten Lösung lässt man unter gutem Rühren in 2–3 Minuten 200–300 cm³ einer 18-proz. Salzsäure (1 Teil konz. Säure + 1 Teil Wasser) zufließen. Es entsteht dabei eine feste Gallerte, die durch Kneten in einen gleichmässigen Brei, der noch stark alkalisch reagiert, übergeführt wird. Unter intensivem Rühren wird nun weiter 18-proz. Salzsäure (300–400 cm³) hinzugefügt, bis die Aufschlämmung schwach sauer reagiert. Die Säurezugabe wird so reguliert, dass der Brei Kongopapier nie blau färbt. Nachdem sich das pH auf ca. 6 eingestellt hat, wird noch während einer Stunde gut gerührt, und wenn nötig, noch etwas Säure zuge tropft. Dann wird das Gel abfiltriert und durch mehrfaches Aufschlännen in Wasser weitgehend

vom Kochsalz befreit. Nach zweitägigem Trocknen bei 100–120° (ohne Vakuum) und Passieren durch ein Sieb (lichte Maschenweite 0,3–0,4 mm) erhält man ein neutrales, feinsandiges Pulver, das 100–200% seines Gewichtes an Wasser aufzunehmen vermag ohne zusammenzubacken.

Es ist uns bis jetzt noch nicht gelungen, die Herstellung des Silicagels zu standardisieren. Die Silicagele variieren meist etwas in ihrer Fähigkeit, Wasser aufzunehmen. Aber auch bei gleicher Aufnahmefähigkeit für Wasser sind noch Unterschiede, die sich im Trennungseffekt auswirken, vorhanden. Es empfiehlt sich daher, einzelne Silicagelchargen mit bekannten Substanzen auszutesten und die optimalen Bedingungen für die Wasserzugabe zum Gel einerseits und für die Alkoholzugabe zum Lösungsmittel anderseits von Fall zu Fall auszuprobieren. Das bei 100–120° getrocknete Silicagel wurde bisher immer als trockenes Silicagel bezeichnet, obwohl es beim Erhitzen im Hochvakuum auf 150–200° noch 3–5% Wasser abgibt¹⁾.

2. Ausführung der Chromatographie. Die in dieser Arbeit mitgeteilten Versuche haben wir mit Einwägen von 5–100 mg Substanz ausgeführt. Es hat sich als zweckmässig erwiesen, für diese Substanzmengen Säulen aus 36 g Silicagel zu bereiten. Zur Herstellung einer mit Wasser gesättigten Silicagelsäule wird das trockene Silicagel in einem Becherglas mit der entsprechenden Menge Wasser, wozu bei einer Wasseraufnahmefähigkeit von beispielsweise 150% 54 cm³ Wasser nötig sind, innig vermischt. Das so erhaltene homogene, noch etwas stäubende Pulver wird mit dem Eluierungsmittel, z. B. wassergesättigtem Essigester mit 0,5% Methanolgehalt, zu einem dünnen Brei angerührt und in eine gewöhnliche Chromatographieröhre (innerer Durchmesser 2,2–2,3 cm, Hahnrohre), die an ihrem unteren Ende mit etwas Watte abgedichtet ist, eingefüllt. Durch vorsichtiges Rühren mit einem Glasstab lässt man eventuell vorhandene Luftblasen entweichen und das überschüssige Lösungsmittel abtropfen. Dann wird die Substanz sofort, entweder in fester Form (vermischt mit etwas Silicagel) oder gelöst in 0,5 bis 1 cm³ Pyridin, Methanol oder Chloroform auf die Säule gegeben. Wenn sich das Eluierungsmittel zur Lösung der Substanz eignet, wird dieses verwendet. Während Scillaglykose im allgemeinen trocken auf die Säule gebracht werden können, ist es für Digitalisglykose vorteilhafter, sie gelöst zu verwenden. Durch teilweises Schliessen des Hahns oder durch geringen Überdruck wird die Abflussgeschwindigkeit so reguliert, dass 25 cm³ des Eluierungsmittels in 3–5 Minuten aus der Säule abtropfen. Anzahl und Volumen der einzelnen Fraktionen richten sich nach der zu untersuchenden Substanz. Die einzelnen Fraktionen werden eingedampft, getrocknet und gewogen.

Die Anzahl und die Lage der Konzentrationsmaxima in unseren Figuren geben Anhaltspunkte über die Zusammensetzung des untersuchten Präparates. Es muss aber betont werden, dass das Fehlen eines Maximums an einer bestimmten Stelle wohl eine bestimmte Substanz ausschliesst, während das Vorhandensein dieses Maximums die Anwesenheit dieser Substanz wohl wahrscheinlich macht, sie aber noch nicht beweist. Wie aus unseren Versuchen des öfteren hervorgeht, verbergen sich unter einem Maximum oft zwei oder mehrere Verbindungen, so dass dann in einem Versuch nicht entschieden werden kann, welche von den in Betracht kommenden Substanzen vorliegt. Hier kann dann meistens ein zweiter, unter veränderten Verhältnissen ausgeführter Versuch die Entscheidung bringen. Nach Möglichkeit wird man die einzelnen Fraktionen auch noch durch Kristallisation, Farbreaktion, Schmelzpunkt und optische Drehung charakterisieren.

Wenn die Silicagelsäule bei der Trennung und Bestimmung von Herzglykosiden und ihren Derivaten vor allem ein analytisches Hilfsmittel darstellt, so können damit in kleinem Masstab doch auch präparative Versuche ausgeführt werden. In einzelnen Versuchen haben wir mit Hilfe einer Säule aus 36 g Silicagel bis zu 1 g Substanzgemisch fraktionieren können. Die Grösse der Einwaage richtet sich nach den Eigenschaften des vorliegenden Präparates und der Anzahl der zu erwartenden Komponenten, was in einem Vorversuch festgestellt werden muss. Im allgemeinen hat sich die Säule aus 36 g Silicagel zur Aufteilung von Glykosidgemischen bis 100 mg Substanz gut bewährt, und man wird deshalb in der Regel für grössere Substanzmengen auch grössere Säulen verwenden.

¹⁾ Das trockene Silicagel nimmt beim Stehen an der Luft rasch Feuchtigkeit auf.

Zusammenfassung.

Für die qualitative und quantitative Bestimmung von Glykosiden und Aglykonen des Scilla- und des Digitalis-Strophanthus-Typs ist die Silicagelsäule nach dem Prinzip der Chromatographie geeignet. Es gelingt mit ihr, auch komplizierte Gemische in ihre Komponenten aufzuteilen und einzelne Verbindungen auf Reinheit und Einheitlichkeit zu prüfen.

Der optimale Wassergehalt des Silicagels spielt bei der Komponententrennung eine bedeutsame Rolle und muss ausprobiert werden, wobei in den Extremen einerseits gesättigtes, anderseits trockenes Silicagel oder dann solches mit dazwischen liegendem Wassergehalt verwendet wird. Auch das Eluierungsmittel (z. B. Essigester, Chloroform) kann trocken oder wasserhaltig und mit mehr oder weniger grossen Zusätzen von Alkoholen angewandt werden. Das erlaubt bei der Ausführung der Versuche eine grosse Variationsmöglichkeit.

Es werden die Ergebnisse von Versuchen mit natürlichen und künstlich zusammengesetzten Glykosid- und Aglykongemischen und mit einzelnen Glykosiden mitgeteilt und graphisch dargestellt.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium *Sandoz*, Basel.

178. Sarnovid (Substanz Nr. 799).

Glykoside und Aglykone, 79. Mitteilung¹⁾

von **F. Reber** und **T. Reichstein**.

(11. VI. 51.)

Aus den Samen einer Strophanthusvariante, die vorläufig als Strophanthus spec. var. sarmentogenifera Nr. MPD 50 bezeichnet wurde und die später genauer beschrieben werden soll, wurde kürzlich unter anderem ein Glykosid isoliert, das zunächst als Substanz Nr. 799 bezeichnet wurde²⁾. Es wurde dort bereits vermutet, dass es sich um einen neuen Stoff handelt. Dies erwies sich als richtig; der Stoff wird in Zukunft als Sarnovid bezeichnet.

Sarnovid gibt bei der *Keller-Kiliani*-Reaktion keine Blaufärbung und wird bei halbstündigem Kochen mit 0,05-n. H₂SO₄ in 50-proz. Methanol nicht gespalten. Zur Konstitutionsaufklärung wurde daher die Hydrolyse mit HCl in Aceton nach der Methode von *Mannich & Siewert*³⁾ durchgeführt. Sie gelang hier mit überraschend

¹⁾ 78. Mitteilung, *A. Aebi & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 1277 (1951).

²⁾ *J. v. Euw, F. Reber & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 413 (1951).

³⁾ *C. Mannich & G. Siewert*, *B.* **75**, 737 (1942).