

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

86. Jahrg. Nr. 10

S. 1235 – 1388

203. Rudolf Tschesche, Gernot Grimmer und Friedlieb Seehofer: Über pflanzliche Herzgifte, XXIV. Mitteil.: Die quantitative Trennung und Identifizierung von Herzgiftglykosiden aus *Digitalis purpurea* und *lanata* durch „echte Verteilungschromatographie an Papier“

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 11. Juni 1953)

Durch Tränken von Filtrierpapier mit einer Phase eines geeigneten zweiphasigen Lösungsmittelgemisches, während die andere Phase zum Entwickeln des Glykosidgemisches verwendet wird, läßt sich eine ausgezeichnete Trennung von Herzgiften unter kreisförmiger Lokalisierung auf dem Papier erreichen. Dieses Verfahren wird als „echte Verteilungschromatographie an Papier“ bezeichnet. Es lassen sich so Mengen bis 300 μg trennen und nachher in den Flecken quantitativ bestimmen. Es werden die bekannten colorimetrischen Bestimmungsmethoden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit verglichen und diejenige mit Xanthidrol als besonders geeignet befunden.

Die bisherigen Verfahren der Papierchromatographie von Glykosiden der Digitalis-Gruppe können nicht als befriedigend bezeichnet werden. Es wurden zwar eine große Zahl von Lösungsmittelgemischen auf verschiedenen Papiersorten untersucht, ohne daß eine zufriedenstellende Lösung des Problems gefunden wurde.

So berichten A. B. Svendsen und K. B. Jensen¹⁾, daß Gitoxin schon beim Auftragen von 10 μg eine Schwanzbildung (trail) auf dem Papier zeigt, also keinen runden Fleck liefert. Dieser Übelstand kann zwar durch Erniedrigung der aufgetragenen Substanzmenge teilweise unterdrückt werden, es kommt aber dann nach den Angaben der Autoren zu einer Erniedrigung der R_F -Werte. E. Habermann, W. Müller und A. Schreglmann²⁾ geben eine Belastungsgrenze des Papiers von 2–6 μg an, innerhalb deren brauchbare Chromatogramme erzielbar sind, aber auch hierbei läßt sich die Schwanzbildung nicht vollkommen unterdrücken; sie befindet sich nur unter der Nachweisbarkeitsgrenze, die bei etwa 1 μg liegt. Die Autoren schreiben: „Bei der Chromatographie und der Elution kleiner Mengen der Digitalis-Stoffe bleibt stets etwas auf der Strecke. Diese Verluste fallen nach unseren Erfahrungen ernstlich ins Gewicht, zumal bei den Gemischen nicht sicher auszuschließen ist, auf welche Fraktionen sie sich vorzugsweise verteilen.“

G. Vastagh und J. Tuzson³⁾ haben durch Papierchromatographie eine Trennung der Lanatoside (Digilanide) nicht erreichen können. Um die starke Adsorption an der Oberfläche der Cellulose herabzusetzen, könnte man auch im Falle der Herzgifte ein Imprägnieren des Papiers mit Kautschuklatex oder Aluminiumhydroxyd versuchen, doch ist das Verfahren unhandlich und die Eigenschaften der imprägnierten Papiere sind variabel und schwer konstant zu erzielen. Ein anderer Weg, der aussichtsreich schien, war eine „echte Verteilungschromatographie an Papier“ mit den Herzgiftglykosiden.

1) *Pharmac. Acta Helvetica* **25**, 241 [1950].

2) *Arzneimittel-Forsch.* **3**, 30 [1953].

3) *Pharmaz. Zentralhalle Deutschland* **92**, 88 [1953].

Es seien zunächst einige Bemerkungen vorausgeschickt, um den Begriff der „echten Verteilungschromatographie an Papier“ näher zu erläutern, da diese Bezeichnung schon in der Literatur verwendet worden ist, ohne daß unseres Erachtens seine Anwendung immer zu Recht bestand. Über das Wesen der Papierchromatographie scheinen bisher keine einheitlichen Vorstellungen zu bestehen⁴⁾. Betrachtet man einen feuchten Papierstreifen als stationäre Phase und läßt an diesem ein mit Wasser nicht mischbares Lösungsmittel mit einem gelösten Stoff oder einem Stoffgemisch vorbeistreichen, so ergibt sich mit ihm primär ein echter Verteilungsvorgang zwischen Wasser und angewandtem Lösungsmittel. Man kann aber auch eine Papierchromatographie mit einphasigen Lösungsmitteln oft mit guten Ergebnissen durchführen. Ein Beispiel hierfür bildet das Gemisch Butanol-Pyridin-Wasser, das bei der Trennung von Zuckern verwendet wird. Im Verhältnis 3:1:3 ist es zweiphasig, während es im Mischungsverhältnis 3:2:1.5 nur eine Phase bildet. Danach könnte man die Papierchromatographie allein als Adsorptionsvorgang deuten. Für die Tatsache, daß die Adsorption eine wesentliche Rolle spielt, spricht weiter, daß man mit Hilfe der Papierchromatographie optische Antipoden trennen kann⁵⁾. Diese Feststellung ist mit einem reinen Verteilungsvorgang zwischen zwei Phasen optisch inaktiver Lösungsmittel nicht zu verstehen. Sie kann nur durch Bildung von Adsorptions-Verbindungen zwischen den optischen Antipoden und der optisch aktiven Cellulose zu diastereoisomeren Zwischen-Verbindungen erklärt werden.

Wir möchten den Begriff der „echten Verteilungschromatographie an Papier“ auf einen Vorgang begrenzen, bei dem die Cellulose als Träger einer stationären Phase verwendet wird, über die die mobile Phase gleichsam als Film hinweggleitet. Sie entspricht damit weitgehend der Verteilungschromatographie an Silicagel, bei der Wasser als stationäre Phase benutzt wird, über das wassergesättigter Essigester oder ein anderes mit Wasser nicht mischbares Lösungsmittel mit dem in ihm gelösten Stoff hinweggeführt wird⁶⁾. Man kann nun das Papier, mit besonderem Vorteil, wie wir fanden, nicht mit Wasser, sondern auch mit mit Wasser gesättigten organ. Lösungsmitteln wie Alkoholen, Estern usw., die mit ihm nicht vollkommen mischbar sind, tränken und als bewegliche Phase wäßrige Lösungsmittelmische verwenden, also gerade umgekehrt, wie im allgemeinen bisher gearbeitet wurde. Das hat noch den Vorteil, daß sich die R_F -Werte mit der Länge der Laufstrecke nicht ändern, während dies naturgemäß der Fall ist, wenn man zum Tränken des Papiers mit Wasser mischbare Lösungsmittel als stationäre Phase verwendet.

Natürlich wird man damit rechnen müssen, daß der Effekt der Verteilung durch den der Adsorption beeinflußt wird. Daß der Adsorptionseffekt auch bei der „echten Verteilungschromatographie“ eine Rolle spielt, beweist die Tatsache, daß sich die R_F -Werte nicht in ihrer Reihenfolge umkehren, wenn man die beiden Phasen vertauscht, d.h. die wäßrige Phase zur stationären macht und mit der alkoholischen Phase entwickelt. Zum anderen ist die mathematische Beziehung zwischen Verteilungskoeffizient und R_F -Wert ($V = \frac{R_F\text{-Wert}}{1-R_F\text{-Wert}}$) ebenfalls nur dann erfüllt, wenn man einen Proportionalitätsfaktor einführt.

⁴⁾ Vergl. F. Cramer, „Papierchromatographie“, 2. Aufl., Verlag Chemie 1953, Weinheim/Bergstraße, S. 20.

⁵⁾ M. Kotake, T. Sakan, N. Nakamura u. S. Senoh, J. Amer. chem. Soc. **73**, 2973 [1951]; C. E. Dalgliesh, J. chem. Soc. [London] **1952**, 3940.

⁶⁾ F. Sanger, Biochem. J. **39**, 507 [1945], **40**, 261 [1946], **42**, 282 [1948].

Diese „echte Verteilungschromatographie an Papier“ ist zur Trennung der Nebenierenrindenhormone⁷⁾ und von Herzgiften⁸⁾ mit Formamid bzw. Dimethylformamid als stationärer Phase bereits mit gutem Erfolg verwendet worden; es wurden jedoch auch hierbei, im Gegensatz zu unserer Arbeitsweise, zur Entwicklung des Chromatogramms organische, vorwiegend nichtpolare Lösungsmittel verwendet. Sie hat in dieser Form bei Herzgiften den Nachteil, daß viele Verbindungen dieser Gruppe hierbei zu niedrige R_F -Werte aufweisen, so daß sie nur im Durchlaufchromatogramm einigermaßen identifiziert werden können. Eine Trennung mit dem von Reichstein⁸⁾ angegebenen Benzol-Chloroform-Gemisch als mobile Phase ist bei den Lanatosiden A, B und C nicht möglich, da sie praktisch gleiche R_F -Werte zeigen. Wir haben daran anknüpfend eine Reihe von Lösungsmitteln, die nicht mit Formamid mischbar sind, als bewegliche Phase auf formamidgetränktem Papier versucht. Weder Benzol-Chloroform-Gemisch, Chloroform, aliphatische Ester, noch aromatische Verbindungen wie Benzol, Toluol, Anisol, Chlorbenzol, Dimethylanilin, Benzylalkohol, Nitrobenzol, Benzoesäure-methyl- und -äthylester sowie verschiedene Chlor- und Methoxy-benzoesäureester ergaben deutliche Unterschiede der Lanatoside A, B und C auf dem Papier. Lediglich Digitoxin, Gitoxin und Acetylgitoxin bzw. Acetyldigitoxin lassen sich z. B. mit Benzoesäureester als kreisrunde Flecken glatt trennen. Bei der Suche nach anderen Lösungsmitteln an Stelle von Formamid als stationäre Phase zeigten einige aromatische Verbindungen, wie z. B. Benzoesäureester und Dimethylanilin, beim Entwickeln des Chromatogramms mit Wasser als bewegliche Phase für die Lanatoside zwar unterschiedliche R_F -Werte, durch eine Diffusion der Glykoside in der stationären Phase waren jedoch die Substanzflecke viel zu groß und völlig verwaschen.

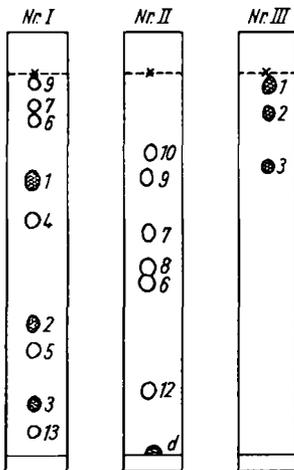
Sehr gute Ergebnisse lassen sich jedoch dann erzielen, wenn man als stationäre Phase mit Wasser gesättigte aliphatische Alkohole (C_6-C_8) oder Ester von Dicarbonsäuren wie Malonsäure und Oxalsäure verwendet. Als mobile Phase dient Wasser, dem zur Erhöhung der Löslichkeit der Glykoside Formamid zugesetzt wird. Die angewandten Lösungsmittel haben dazu noch den Vorteil, daß ihr Dampfdruck bei Zimmertemperatur nicht zu groß ist und sie im Trockenschrank bei 100° trotzdem noch leicht entfernt werden können. Zur Trennung der Lanatoside A, B und C, Gitoxin und Digitoxin hat sich ein Gemisch aus *n*-Octanol, Pentanol, Wasser und Formamid im Verhältnis 6:2:8:2 Volumteile (Gemisch I) bewährt. Auf dem Papier von Macherey und Nagel (Düren) Nr. 63 lassen sich so bis zu 0.3 mg am Startpunkt auftragen und glatt trennen. Glykoside, die weniger wasserlöslich als die Lanatoside sind und in dem Lösungsmittelgemisch I nicht weit genug wandern (R_F -Wert unter 0.28), wie Gitoxin, Acetylgitoxin α und β , Gitoxigenin, Digitoxin, Acetyldigitoxin α und β , Digitoxigenin und Digoxin, können dann sehr gut aufgetrennt werden, wenn man den Formamid-Anteil im Gemisch erhöht. Mit der Mischung Octanol, Pentanol, Wasser, Formamid (6:2:1:4) vergrößern sich die R_F -Werte der genannten Verbindungen so weit, daß sie sich über die gesamte Skala der R_F -Werte verteilen. In diesem Gemisch II laufen die stärker wasserlöslichen Glykoside, wie z. B. die Lanatoside, mit der Lösungsmittelfront. In ihm können auch peracetylierte Glykoside gut papierchromatographisch aufgetrennt werden.

⁷⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton u. E. H. Keutmann, Science [New York] 111, 6 [1950].

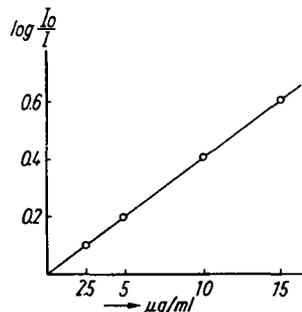
⁸⁾ Th. Reichstein u. O. Schindler, Helv. chim. Acta 34, 108 [1951]; s. a. E. Heftmann u. A. J. Levant, J. biol. Chemistry 194, 703 [1952].

Für Glykoside, die noch wasserlöslicher als die Lanatoside sind, also im Lösungsmittelgemisch I sich mit der Front bewegen, kann mit Vorteil ein Gemisch Pentanol/Wasser (1:1) (Gemisch III) verwendet werden. In dieser Mischung haben die Lanatoside A, B und C R_F -Werte unter 0.25. Über die Ergebnisse mit dem Gemisch III und den im Verhalten ähnlichen Gemischen aus Malonsäure- und Oxalsäure-diäthylester bei stark wasserlöslichen Glykosiden werden wir später bei den Herzgiften aus *Convallaria majalis* berichten.

Glykoside bzw. Genine ⁹⁾	Lösungsmittelgemisch		
	I	II	III
1) Lanatosid A (Digilanid A)	28	d ¹⁰⁾	03
2) „ B (Digilanid B)	66	d	10
3) „ C (Digilanid C)	86	d	25
4) Desacetyl-lanatosid A (Purpureaglykosid-A)	39	d	
5) Desacetyl-lanatosid B (Purpureaglykosid-B)	73	d	
6) Gitoxin	18	55	
7) Acetylgitoxin α und β	08	41	
8) Gitoxigenin	17	52	
9) Digitoxin	03	27	
10) Acetyldigitoxin α und β	02	21	
11) Digitoxigenin	02.5	—	
12) Digoxin	29	72	
13) Digitalinum verum	95	d	
14) Gitorin	78	d	



Abbild. Chromatogramme mit Lösungsmittelgemisch I, II und III



Eichkurve des Xanthhydrol-Testes (Lanatosid A)

Das Gemisch I hat sich auch bei den Untersuchungen der Glykoside aus *Asclepias curassavica*, *Evonymus atropurpurea* und *Bowiea volubilis* H. ausge-

⁹⁾ Wir möchten der Firma Beiersdorf & Co., Hamburg, und Hrn. Prof. Dr. A. Stoll auch an dieser Stelle für die Überlassung einer Reihe von Glykosid-Proben vielmals danken.

¹⁰⁾ d bedeutet: läuft mit der Front.

zeichnet bewährt. Nachstehend geben wir eine Aufstellung der R_F -Werte in den 3 Lösungsmittelgemischen mit Papier von Schleicher & Schüll Nr. 2043 a bei 17° (Zahlen bedeuten 100 R_F).

Die R_F -Werte der aufgetragenen Stoffe sind bei dem angegebenen Verfahren unabhängig von der aufgetragenen Menge. Da man das Papier von Macherey und Nagel Nr. 63 mit einem Glykosidgemisch bis 300 μg belasten kann, sind nunmehr 1–2% eines begleitenden Glykosids neben dem Hauptbestandteil leicht zu entdecken. Mit der Ausbildung definierter Flecke über einen großen Konzentrationsbereich konnte nunmehr auch das Problem der quantitativen Bestimmung der Herzgiftglykoside auf dem Papier gelöst werden.

Dabei bestimmt man entweder zunächst die Lage der einzelnen Flecke durch ein Leitchromatogramm, bei dem man die Substanzflecke durch Besprühen mit Trichloroessigsäure¹⁾ oder Antimontrichlorid-Lösung¹¹⁾ sichtbar macht. Man schneidet dann auf dem eigentlichen, daneben gelaufenen Chromatogramm die entsprechenden Stellen quadratisch aus. Oder aber man macht die Herzgifte auf dem Papier durch vorsichtiges Anentwickeln mit dem Reagens nach Kedde¹²⁾ gerade sichtbar. Die colorimetrische Bestimmung erfolgt anschließend nach Ablösen der Glykoside vom Papier mit Xanthhydrol¹³⁾. Die Bestimmung nach vorherigem Anfärben nach Kedde ist weniger genau und führt im allgemeinen zu einem Verlust von etwa 10%. Daß das zuletzt genannte Verfahren möglich ist, beruht darauf, daß das Reagens nach Kedde auf den Aglykonanteil der Cardenolid-Glykoside anspricht, während Xanthhydrol den Zuckeranteil erfaßt. Bei dem Sichtbarmachen der Flecke mit Trichloroessigsäure oder Antimontrichlorid ist die Veränderung der Zucker so weitgehend, daß eine quantitative Bestimmung nicht mehr möglich ist.

Da für eine quantitative Bestimmung der Glykoside auf dem Papier ein empfindlicher colorimetrischer Test Voraussetzung ist, haben wir die bekannten in der Chemie der herzwirksamen Glykoside benutzten Verfahren auf ihre Empfindlichkeit untersucht. Legt man der Farbreaktion nach Legal (mit Nitroprussidnatrium und Alkali)¹⁴⁾ als der unempfindlichsten den Wert 1 zu, so ist diejenige mit Naphthochinonsulfonsäure¹⁵⁾ hinsichtlich der Ansprechbarkeit in der gleichen Größenordnung. Der Raymond-Test¹⁶⁾ (Dinitrobenzol und Alkali) ist 4mal, die Reaktion nach Kedde (Dinitrobenzoesäure und Alkali) 5mal, die Keller-Kiliani-Reaktion¹⁷⁾ (Eisen(III)-sulfat, Eisessig und Schwefelsäure) 5mal, der Baljet-Test¹⁸⁾ (Pikrinsäure und Alkali) 24mal, der Carbazol-Test¹⁷⁾ 15mal und die Reaktion mit Xanthhydrol 32mal so empfindlich. Als Testsubstanz wurde hierbei Lanatosid A verwendet. Das Verfahren mit Xanthhydrol hat noch den Vorteil, daß das Reagens mit Filterpapier keine Blindwerte liefert. Die Farbe ist abhängig von der Natur der im Glykosid gebundenen Zucker. Rhamnose gibt ein Absorptionsmaximum bei 4800 Å, Fructose bei 4100 Å und Digitoxose bei 5260 Å. Es lassen sich so noch 0.25 μg in einem Fleck an Lanatosid bestimmen, da die erzielte Fär-

¹¹⁾ D. Lawday, Nature [London] 170, 415 [1952].

¹²⁾ Ausführung nach J. E. Bush u. D. A. H. Taylor, Biochem. J. 52, 643 [1952]; D. L. Kedde, Dissertat. Leyden. ¹³⁾ M. Pesez, Ann. pharmac. franç. 10, 104 [1952].

¹⁴⁾ Nach T. Canback, J. Pharmacy Pharmacol. 1, 201 [1949].

¹⁵⁾ A. T. Warren, F. O. Howland u. L. W. Green, J. Amer. pharmac. Assoc. 37, 186 [1948]. ¹⁶⁾ W. D. Raymond, Analyst 63, 478 [1938].

¹⁷⁾ Ausführung nach T. Reichstein u. J. von Euw, Helv. chim. Acta 31, 886 [1948].

¹⁸⁾ Nach F. K. Bell u. J. C. Krantz, J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. 37, 297 u. 38, 107 [1949]; J. Pharmacol. exp. Therapeut. 88, 14 [1946].

bung gerade noch im Beckman-Spektrometer ablesbar ist. Bei 20 quantitativen Analysen von Gemischen der Digilanide, Gitoxin und Digitoxin lag die Fehlergrenze der Methode bei etwa (\pm) 3%. Voraussetzung für die quantitative Bestimmung ist natürlich die Kenntnis der chemischen Natur des Glykosids in dem zu untersuchenden Fleck und die Bestimmung seines Farbwertes in einem Parallelversuch. Nach diesem Verfahren sind z.B. in 100 μ g Lanatosid noch 1–2 μ g Lanatosid A und C bestimmbar.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit und der eine von uns (Grimmer) für ein ihm gewährtes Stipendium.

Beschreibung der Versuche

Das Lösungsmittelgemisch I für wasserlösliche Glykoside wird durch Mischen von 8 Tln. *n*-Octanol, 2 Tln. Pentanol (Gärungsamylalkohol), 8 Tln. Wasser und 2 Tln. Formamid bereitet. Für weniger wasserlösliche Glykoside dient das Gemisch II aus 6 Tln. *n*-Octanol, 2 Tln. Pentanol, 1 Tl. Wasser und 4 Tln. Formamid. Die R_F -Werte sind hier stärker temperaturabhängig.

Für stark wasserlösliche Glykoside kommen die Gemische

III a Pentanol/Wasser (1:1)

III b Malonsäure-diäthylester/Wasser (1:1) und

III c Oxalsäure-diäthylester/Wasser (1:1)

für die Verteilungschromatographie an Papier in Frage.

In jedem Fall wird das Gemisch nach dem Durchschütteln bei bestimmter Temperatur und Absitzen in leichte und schwere Phase getrennt. Mit der organischen Phase wird der Papierstreifen stark eingesprüht¹⁹⁾. Das Papier wird einige Minuten lösungsmittelfeucht liegengelassen und die Substanz nach dem Abpressen zwischen Filterpapier auf die Startlinie gebracht. Bei quantitativen Bestimmungen empfiehlt es sich, bei der Startstelle unter das feuchte Papier einen Glasstab zu schieben, um beim Auftragen eine Berührung mit der Unterlage zu vermeiden. Entwickelt wird mit der wäßr. Phase des Gemisches.

Am besten werden 5 bis 20 μ l aufgebracht. Als Lösungsmittel ist Methanol/Pentanol (1:1) zu verwenden, um nicht die Imprägnierung des Papiers am Startpunkt herunterzulösen. Reines Gitoxin, das besonders schwer löslich ist, wird mit möglichst wenig Pyridin in Lösung gebracht und die Lösung mit Methanol/Pentanol auf das gewünschte Volumen eingestellt. Es wird absteigend mit der schweren Phase (Wasser/Formamid) entwickelt. Die Laufzeit des Gemisches I beträgt 2–3 cm in der Stunde, das Gemisch II läuft halb so schnell. Wegen des verhältnismäßig geringen Dampfdruckes der verwendeten Lösungsmittel sind die R_H -Werte in Chromatographie-Cylindern der Ausmaße 10/50 cm fast unabhängig vom Sättigen der Atmosphäre mit den beiden Phasen. Dies gilt nicht für das Gemisch IIIa (Pentanol/Wasser), bei dem auch nach dem Abpressen der Chromatographiestreifen vom überschüss. Lösungsmittel rasch gearbeitet werden muß. Das Papier von Schleicher & Schüll Nr. 2043a kann bis 120 μ g, das von Macherey und Nagel Nr. 61 bis 300 μ g belastet werden. Das Trocknen der Chromatogramme erfolgt 10 Min. im Trockenschrank bei 100°. Am besten spannt man die entwickelten Streifen in einen Drahtrahmen, in dem sie mit Patentklammern gehalten werden.

Sichtbarmachung der Flecke. a) mit Trichloressigsäure: Das Chromatogramm wird mit einer 20-proz. Lösung von Trichloressigsäure in Chloroform besprüht und anschließend etwa 5 Min. in einem Trockenschrank auf 100° erhitzt. Digitoxigenin und seine Glykoside zeigen je nach Alter der Lösung bzw. Reinheit der Trichloressigsäure unter der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht eine citronengelbe bis rostrote Fluoreszenz. Gitoxigenin und seine Abkömmlinge geben eine leuchtend blaue und Digoxigenin-Deri-

¹⁹⁾ Eine besonders gleichmäßige Verteilung der org. Phase kann auch durch Aufsteigenlassen in das Papier erzielt werden.

vate eine graue bis blaue Fluoreszenz. Die Flecken verblassen nach einigen Wochen. Digitoxose liefert eine schon im sichtbaren Licht zu beobachtende schmutzigblaue Färbung, die sich auch mit allen ihren Glykosiden wiederfindet.

b) Mit Antimontrichlorid: Als Reagens dient eine 20-proz. Antimontrichlorid-Lösung in Chloroform. Diese Färbemethode hat den Vorteil, daß sie gegenüber der Trichloressigsäure-Anfärbung eine gleichmäßige Empfindlichkeit gegenüber den 3 Aglykonen aus Digitalis und ihren Glykosiden aufweist. Dabei können die Flecke schon im sichtbaren Licht gut beobachtet werden, während die Empfindlichkeit im UV weniger ausgeprägt ist. Zur Entwicklung der Färbung wird das Papier nach dem Besprühen mit dem Reagens 1–2 Min. auf 100° erhitzt⁹⁾.

c) Mit Dinitrobenzoesäure und Alkali (Reagens nach Kedde): Eine 2-proz. Lösung von 3.5-Dinitrobenzoesäure in Methanol und wäbr. 2*n* KOH werden im Verhältnis 1:1 vor dem Versuch gemischt; das Chromatogramm wird damit eingesprüht. Die Glykoside erscheinen nach einigen Minuten auf dem Papier ohne Erhitzen als violette Flecke.

Quantitative Bestimmung: Nachfolgend geben wir einen Vergleich der in der Cardenolid-Reihe gebräuchlichen Farbtaste hinsichtlich Beständigkeit der Färbungen und Empfindlichkeit der Reaktion:

1) Pikrinsäure¹⁰⁾: Das Maximum der Farbe liegt bei 4900 Å (20°) und bleibt zwischen 13 und 30 Min. praktisch konstant; 0.1 mg/ml geben $\log I_0/I = 1.700$.

2) Reaktion nach Kedde¹⁰⁾: Mit Lösungen des Reagenzes von 0° und mit 0.5*n* KOH wird nach 9 Min. ein rasch abklingendes Maximum bei 5400 Å erhalten; 0.1 mg/ml geben $\log I_0/I = 0.550$.

3) Reaktion nach Raymond¹⁶⁾: Das Maximum der Reaktion bei 6000 Å tritt selbst mit Lösungen von 0° unter 3 Min. auf; nach 3 Min. geben 0.1 mg $\log I_0/I = 0.430$.

4) Reaktion nach Legal¹⁴⁾: Das Maximum tritt schon unter 30 Sek. auf. Gemessen nach 30 Sek. bei 4700 Å geben 0.1 mg/ml $\log I_0/I = 0.125$.

5) Naphthochinonsulfonsaures Natrium¹⁵⁾: Mit diesem Reagens tritt ein über Stunden haltbares Maximum bei 4480 Å auf. Gemessen nach 15 Min. geben 0.1 mg/ml $\log I_0/I = 0.115$.

6) Xanthydro¹³⁾: Hiermit tritt ein über Stunden haltbares Maximum bei 5260 Å auf (ein zweites Maximum bei 3760 Å ist für die quantitative Bestimmung weniger geeignet). 0.1 mg/ml geben $\log I_0/I = 4.00$; dieser Wert wurde für diese Konzentration berechnet, da die Extinktionshöhe und die Konzentration des Glykosids in dem in Frage kommenden Bereich lineare Abhängigkeit zeigen (siehe Kurvenbild im theoret. Teil).

7) Reaktion nach Keller-Kilian¹⁷⁾: Es tritt hier ein über Stunden beständiges Absorptionsmaximum bei 5950 Å auf; 0.1 mg/ml geben $\log I_0/I = 0.660$ (gemessen nach 60 Min.).

8) Carbazol-Test¹⁷⁾: Die stabile Färbung hat bei Digitoxose und bei Herzgiften, die mit Digitoxose verknüpft sind, ein Absorptionsmaximum bei 5300 Å. Da manche Geneine mit Schwefelsäure ebenfalls eine Farbreaktion geben, treten hierdurch Störungen auf; 0.1 mg/ml geben $\log I_0/I = 1.84$.

Die Verfahren 6, 7 und 8 sprechen auf den Zuckeranteil der Glykoside an.

Als Test-Substanz wurde in jedem Falle Lanatosid A verwendet.

Ausführung der quantitativen Bestimmung mit Xanthydro: 10 mg Xanthydro (Merck) werden in 100 ml Eisessig gelöst und mit 1 ml konz. Salzsäure versetzt. Das Reagens wird am besten stets frisch bereitet. Das Filtrierpapier mit dem Substanzfleck wird zusammen mit einem Papierstück gleicher Größe (Blindwert) in je 4 cm Reagens-Lösung 10 Min. bei 40° stehengelassen. Dann wird in jedem Falle das Papier mit einem Glasstab herausgenommen und abgespritzt; sämtliche Proben werden in einem siedenden Wasserbad 3 Min. erhitzt. Anschließend werden die Lösungen sofort mit kaltem Wasser abgekühlt und colorimetriert. Das zur Bestimmung des Blindwertes verwendete Papierstück soll nicht gefärbt sein. Die erhaltene Färbung ist über Stunden haltbar und klingt erst nach 24 Stdn. ab.