

FRITZ KAISER und ALFRED POPELAK

Über Rauwolfia-Alkaloide, VII*)

**Die papierchromatographische Trennung von
Rauwolfia-Alkaloiden**Aus dem Chemischen Forschungslaboratorium der C. F. Boehringer & Söhne GmbH,
Mannheim-Waldhof

(Eingegangen am 12. September 1958)

Mit den Lösungsmittelgemischen Heptan/Methyläthylketon verschiedener Zusammensetzung können an mit Formamid imprägniertem Papier die Rauwolfia-Alkaloide vollständig aufgetrennt werden. Es werden erstmals die R_F -Werte der meisten bis heute bekannten Rauwolfia-Alkaloide angegeben.

Die Erforschung der Inhaltstoffe von Rauwolfia-Arten hat seit der Isolierung und Aufklärung des „sedativen Prinzips“ der *Rauwolfia serpentina*, des Reserpins, durch J. M. MÜLLER, E. SCHLITTLER und H. J. BEIN¹⁾ im Jahre 1952 einen geradezu stürmischen Verlauf genommen. Waren bis dahin 9 Alkaloide aus *Rauwolfia serpentina* und ein Alkaloid aus *Rauwolfia canescens* bekannt²⁾, so ist inzwischen die Anzahl der aus etwa 20 Rauwolfia-Arten isolierten Alkaloide auf über 40 angewachsen³⁾. Diese erfolgreiche Entwicklung ist nicht zuletzt dem verstärkten Einsatz chromatographischer Trennungsmethoden an Säulen zu verdanken. Es fällt auf, daß über die Anwendung der Papierchromatographie auf dieses Gebiet zunächst noch in keiner Arbeit berichtet wurde. Erst im Jahre 1955, als der größere Teil der bis jetzt bekannten Alkaloide isoliert worden war und man sich somit in der Lage sah, wenigstens die wichtigsten der auf Papierchromatogrammen erkennbaren Alkaloidflecken zu identifizieren, wurden die ersten Angaben über papierchromatographische Methoden veröffentlicht.

Diese standen im wesentlichen im Zusammenhang mit Berichten über die Gewinnung neuer Alkaloide aus Rauwolfia-Drogen⁴⁻⁶⁾, mit der quantitativen Bestimmung des Reserpins in Drogen oder in pharmazeutischen Zubereitungen^{7-10) **)}, mit Unter-

*) VI. Mittel.: E. HAACK, A. POPELAK und H. SPINGLER, *Naturwissenschaften* **43**, 328 [1956].**) Die papierelektrophoretische Auftrennung von Rauwolfia-Alkaloiden, hauptsächlich zum Zweck der Reserpinbestimmung, wurde beschrieben von: E. H. SAKAL und E. J. MERRILL, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **43**, 709 [1954]; S. LJUNGBERG¹⁰⁾; M. SAHLI, *Pharmac. Acta Helvetiae* **33**, 1 [1958].1) *Experientia* [Basel] **8**, 338 [1952].2) S. W. SCHNEIDER, „Die Erforschung der Rauwolfia-Alkaloide von ihren Anfängen bis zur Gegenwart“, *Arzneimittel-Forsch.* **11**, 666 [1955].3) S. die neuesten Zusammenfassungen von E. SCHLITTLER in „Rauwolfia: Botany, Pharmacognosy, Chemistry and Pharmacology“, J. and A. Churchill Ltd., London 1957, und A. HOFMANN, *Planta Medica* **5**, 107 [1957].4) F. A. HOCHSTEIN, K. MURAI und W. H. BOEGEMANN, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 3551 [1955].5) D. S. RAO und S. B. RAO, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **44**, 253 [1955].6) A. F. ST. ANDRÉ, B. KORZUN und F. WEINFELDT, *J. org. Chemistry* **21**, 480 [1956].7) D. BANES, J. CAROL und J. WOLFF, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **44**, 640 [1955].8) W. H. McMULLEN, H. J. PAZDERA, S. R. MISSAN, L. L. CIACCIO und T. C. GRENFELL, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **44**, 447 [1955].9) J. CAROL, D. BANES, J. WOLFF und H. O. FALLSCHEER, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **45**, 200 [1956].10) S. LJUNGBERG, *Svensk farmac. Tidskr.* **61**, 305 [1957].

suchungen über biologische Eigenschaften von Reserpin¹¹⁾ und als Hilfsmittel zur Identifizierung bzw. zum Vergleich von Extrakten aus Drogen^{9,12)}. Dazu kamen sowohl Lösungsmittelsysteme auf Wasserbasis, als auch solche für die sogenannte „echte Verteilungschromatographie an Papier“ mit Imprägnierung des Papiers mit Formamid oder Propylenglykol/Eisessig zur Anwendung.

Nach unseren Erfahrungen lassen sich am besten Lösungsmittelsysteme mit Formamid als stationärer Phase verwenden. Als mobile Phasen eignen sich viele Gemische aus aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen wie Hexan, Heptan, Isooctan, Cyclohexan, Dekalin, Xylol oder aus Äthern wie Diisopropyläther und Di-n-butyläther mit Methyläthylketon, Pentanon, Hexanon, Heptanon, Tetrahydrofuran, Äthylacetat, Dioxan, Chloroform oder anderen Chlorkohlenwasserstoffen.

Besonders vorteilhaft verläuft die Chromatographie in mit Ammoniak gesättigter Atmosphäre. Man erhält etwas erhöhte R_F -Werte und kleinere, schärfer begrenzte Flecken.

Aus der großen Zahl möglicher Kombinationen, die zur Ausarbeitung einer papierchromatographischen Systematik der Rauwolfia-Alkaloide führen können, haben sich die folgenden bewährt.

Gemisch A: Heptan/Methyläthylketon (1:1)

Gemisch B: Heptan/Methyläthylketon (4:1)

Gemisch C: Heptan/Methyläthylketon (2:1), NH_3 -Atmosphäre

Gemisch D: Heptan/Methyläthylketon (1:1), NH_3 -Atmosphäre

Gemisch E: Xylol /Methyläthylketon (1:1), NH_3 -Atmosphäre

Das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b mgI) ist mit Formamid imprägniert. Die Lösungsmittelgemische sind mit Formamid gesättigt.

Die mit diesen 5 Gemischen erhaltenen R_F -Werte von 30 Rauwolfia-Alkaloiden sind in Tab. 1 aufgenommen. Es handelt sich um Mittelwerte aus zahlreichen Chromatogrammen von Methanolextrakten aus etwa 20 verschiedenen Rauwolfia-Arten und von Reinalkaloiden. Chromatographiert wurde immer nach dem aufsteigenden Verfahren mit Papierstreifen der Formate 11.5×28 cm und 11.5×36 cm. Die R_F -Werte sind bei genauer Einhaltung der im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen mit Abweichungen bis zu $\pm 5\%$ reproduzierbar.

Um das Erkennen von Zusammenhängen zwischen den R_F -Werten und der Konstitution der Alkaloide zu erleichtern, ist in Tab. 1 die Rubrik „Struktur“ mit aufgenommen. Die dort verzeichneten Angaben beziehen sich auf die Formelbilder I bis VII der 7 in Rauwolfia-Arten aufgefundenen Alkaloid-Typen (s. S. 282).

Das *Sichtbarmachen* der getrennten Flecken auf den Chromatogrammen ist relativ einfach. Die meisten Alkaloide fluoreszieren nämlich nach dem Trocknen der Chromatogramme beim Bestrahlen mit UV-Licht der Quarz-Analysenlampe (langwellige Quecksilberlinie $366\text{m}\mu$) mit blauen, grünen, grünlich grauen und gelben bis gelbbraunen Farben. Die Farbunterschiede stellen ein wertvolles Hilfsmittel für die Identifizierung der Alkaloidflecken bei der Chromatographie von Drogenextrakten bekannter und unbekannter Rauwolfia-Arten dar. Oft finden sich nämlich auf Extraktchro-

¹¹⁾ R. J. BOSCOFF und A. B. KAR, Nature [London] 176, 1077 [1955].

¹²⁾ B. P. KORZUN, A. F. ST. ANDRÉ und P. R. ULSHAFFER, J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. 46, 720 [1957].

Tab. 1. R_F -Werte, Struktur, Fluoreszenz und Farbreaktionen von Rauwolfia-Alkaloiden

Alkaloid	Struktur	$R_F \cdot 100$					Fluoreszenz	
		A	B ^a)	C	D	E	366 m μ	254 m μ
QUARTÄRE ANHYDRONIUM-BASEN		I						
Serpentin		0	0	3	6	27	bl	bl
Alstonin		0	0	3	6	27	bl	bl
Serpentinin		0	0	7	17	76	grbl	grbl
TERTIÄRE INDOL-BASEN		II						
<i>Tetrahydroserpentin-Typ</i>		II						
Ajmalicin = Raubasin = Tetrahydroserpentin = δ -Yohimbin	IIa	82	56	85	95	F ^b)	grgr	grbl
Tetrahydroalstonin	IIb	95	85	97	F	F	grgr	grbl
Aricin = Heterophyllin	IIc	98	82	98	F	F	bror	gebr
Raumitorin	II d	77	41	80	91	F	bror	gebr
Reserpinin = Raubasinin	IIe	96	76	94	98	F	gr	gegr
Reserpilin	II f	40	12	38	58	95	gebr	gebr
Isoreserpilin	II g	67	37	72	84	F	gebr	gebr
<i>Yohimbin-Isomere</i>		III						
Yohimbin		23	10	30	46	75	grgr	grbl
Corynanthin = Rauhimbin		26	12	27	48	78	grgr	grbl
Rauwolscin = α -Yohimbin		46	22	45	65	84	grgr	grbl
Isorauhimbin = 3-Epi- α -yohimbin		10	8	15	30	66	grge	dvi
β -Yohimbin		14	5	15	28	62	grgr	grbl
ψ -Yohimbin		18	8	21	37	67	grge	grge
<i>Reserpin-Typ</i>		IV						
Reserpin	IVa	55	28	60	77	F	gr	gegr
Isoreserpin ^c)	IVb	85	59	76	96	F	gr	gegr
Renoxidin ^d) = Reserpin-N-oxyd		0	0	0	7	58	bl	bl
Deserpidin = Canescin	IVc	60	35	72	82	F	grbr ^e)	grbl
Rescinnamin	IVd	53	26	52	72	F	gr	gegr
Reserpsäure-methylester	IVe	7	0	6	15	58	gr	gegr
Seredin [*])		12	0	10	24	60	ge	ge
Reserpin-Oxydationsprodukt (RZ ₁) ^f)		20	3	83	95	F	gr	gr
Sarpagin = Raupin	V	0	0	0	4	15	Farbreaktion ^g) br	
TERTIÄRE INDOLIN-BASEN		VI						
<i>Anhydro-ajmalin-Typ</i>		VI						
Tetraphyllicin = Serpinin	VIa	10	8	33	48	75	rot	
Rauvomitin	VIb	48	60	97	F	F	rvi	
<i>Ajmalin-Typ</i>		VII						
Ajmalin	VII a	5	0	16	45	70	rot	
Iso-ajmalin	VII b	3	0	16	45	67	rot	
Vomalidin	VII c	46	22	41	61	80	vi	

A bis E: Lösungsmittelgemische siehe Text S. 279.

Abkürzungen der Fluoreszenzen bei Bestrahlung mit UV-Licht von 366 m μ bzw. 254 m μ und der Farbreaktionen: bl = blau, grbl = graublau, grgr = grünlich grau, gebr = gelbbraun, bror = braunorange, gr = grün, gegr = gelbgrün, grge = grüngelb, grbr = graubraun, br = braun, vi = violett, rvi = rotviolett, dvi = dunkel violett.

a) Auf Chromatogrammen von Drogenextrakten sind alle Alkaloide mit $R_F < 0.25$ nicht getrennt.

b) Substanz läuft mit der Lösungsmittelfront.

^{*}) Zusatz b. d. Korr.: Nach J. POISSON, N. NEUSS, R. GOUTAREL und M. M. JANOT, Bull. Soc. chim. France 1958, 1195, ist Seredin 10.11-Dimethoxy- α -yohimbin.

matogrammen Flecken, die zwar gleiche R_F -Werte wie bekannte Alkaloide, aber abweichende Fluoreszenz zeigen. Man kann damit häufig bereits im ersten Extrakt einer Droge die Anwesenheit von noch unbekanntem Substanzen erkennen und hat die Möglichkeit, deren Anreicherung und Isolierung papierchromatographisch zu verfolgen. Ein weiteres sehr wertvolles Charakteristikum ist, daß eine Reihe von Alkaloiden beim Bestrahlen mit kurzwelligem UV-Licht ($254\text{m}\mu$) eine andere Fluoreszenz entwickelt als im langwelligen Bereich. Diese Tatsache kann dann von Bedeutung sein, wenn man bei einer Substanz über die Zuordnung ihrer Fluoreszenz unter langwelligem UV zu Grün oder Grüngrau im Zweifel ist. Eine solche Unsicherheit in der Beurteilung kann dann eintreten, wenn ein Chromatogramm zu lang und bei zu hoher Temperatur getrocknet worden ist (vgl. Versuchsteil). Grünfluoreszenzen verblassen dann zuweilen und lassen sich nicht mehr sicher von grüngrauen Fluoreszenzen unterscheiden. Die meisten der bei $366\text{-m}\mu$ -Bestrahlung grüngrau fluoreszierenden Alkaloide besitzen jedoch unter $254\text{-m}\mu$ -Bestrahlung eine fahl hellblaue Fluoreszenz, was ihre eindeutige Identifizierung erlaubt.

Die Alkaloide des Anhydro-ajmalin-Typs, des Ajmalin-Typs und das Sarpagin fluoreszieren im langwelligen UV nicht und geben unter kurzwelligem UV nur tief dunkelviolette Flecken, die bei Anwesenheit der anderen hell fluoreszierenden Alkaloide nicht sicher erkannt werden können. Sie lassen sich aber mit dem bekannten Indolreagenz¹⁵⁾ Perchlorsäure + Eisen(III)-chlorid als rote, rotviolette oder blauviolette Flecken sichtbar machen.

Sarpagin gibt beim Besprühen der Chromatogramme mit konz. Salpetersäure zunächst dunkelviolette Färbung, die sofort in eine beständige braune Farbe übergeht.

Die von einigen Autoren vorgeschlagene Intensivierung der Fluoreszenzen durch Besprühen und Erhitzen mit Eisessig¹²⁾ oder Trichloressigsäure/Nitroprussidnatrium⁹⁾ ist bei den mit Formamid imprägnierten Chromatogrammen im allgemeinen nicht notwendig. Es trifft zwar zu, daß viele Rauwolfia-Alkaloide von sich aus nur relativ schwach fluoreszieren. Unter den hier gehandhabten Trockenbedingungen entwickeln jedoch alle, abgesehen vom Deserpidin, ihre volle Fluoreszenzfähigkeit.

In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß Reserpin bereits unter Einwirkung von Tageslicht, stärker und schneller noch bei UV-Bestrahlung, eine Substanz bildet, die sehr intensiv grün fluoresziert. Gleiches oder Ähnliches geschieht beim Erhitzen formamidfeuchter

Fortsetzung der Anmerkungen zu Tabelle I.

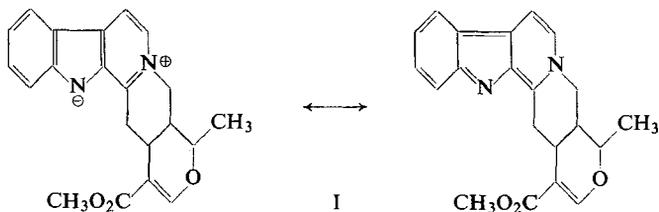
- c) Dargestellt aus Reserpin durch Kochen mit Acetanhydrid¹³⁾.
- d) Dargestellt aus Reserpin durch Oxydation mit H_2O_2 . Renoxidin wurde auch aus *Rauwolfia vomitoria* isoliert¹⁴⁾.
- e) Fluoreszenzintensivierung durch Besprühen mit Trichloressigsäure/Chloramin-Reagenz und Erhitzen.
- f) Dargestellt durch Oxydation von Reserpin mit Natriumnitrit in essigsaurer Lösung.
- g) Farbreaktion für Sarpagin mit konz. Salpetersäure, für die tertiären Indolin-Basen mit Perchlorsäure/Eisen(III)-chlorid-Reagenz.

¹³⁾ H. B. MAC PHILLAMY, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, A. F. ST. ANDRÉ und P. R. ULSHAFFER, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4335 [1955].

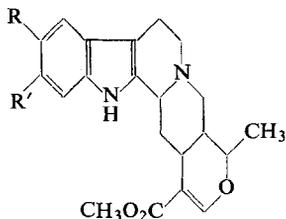
¹⁴⁾ P. R. ULSHAFFER, W. J. TAYLOR und R. H. NUGENT, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **244**, 2989 [1957].

¹⁵⁾ T. A. BENNET-CLARK, M. S. TAMBIAH und N. P. KEFFORD, Nature [London] **169**, 452 [1952].

QUARTÄRE ANHYDRONIUM-BASEN

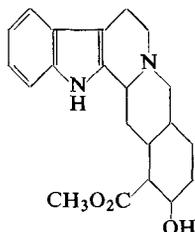


TERTIÄRE INDOL-BASEN

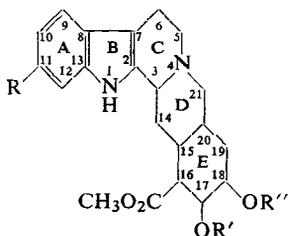


II. Tetrahydroserpentin-Typ

- a: R = R' = H d: R = OCH₃; R' = H
 b: R = R' = H e: R = H; R' = OCH₃
 c: R = OCH₃; f: R = R' = OCH₃
 R' = H g: R = R' = OCH₃

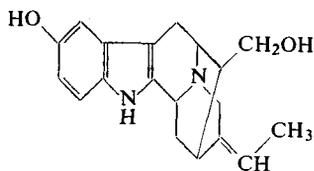


III. Yohimbin-Isomere



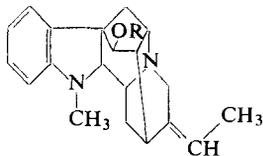
IV. Reserpin-Typ

- a: R = OCH₃; R' = CH₃; R'' = (CH₃O)₃C₆H₂·CO—
 b: R = OCH₃; R' = CH₃; R'' = (CH₃O)₃C₆H₂·CO—
 c: R = H; R' = CH₃; R'' = (CH₃O)₃C₆H₂·CO—
 d: R = OCH₃; R' = CH₃; R'' = (CH₃O)₃C₆H₂·CH:CH·CO—
 e: R = OCH₃; R' = CH₃; R'' = H



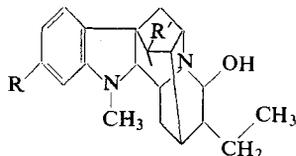
V. Sarpagin (Raupin)

TERTIÄRE INDOLIN-BASEN



VI. Anhydro-ajmalin-Typ

- a: R = H
 b: R = (CH₃O)₃C₆H₂·CO—



VII. Ajmalin-Typ

- a: R = H; R' = OH
 b: R = H; R' = OH
 c: R = OCH₃; R'H = Carbonyl

Reserpinchromatogramme, beim Aufbewahren von in Chloroform oder in Säuren gelöstem Reserpin^{8,16,17)} und bei der Behandlung mit Oxydationsmitteln. Die durch Oxydation mit Natriumnitrit auftretende starke Grünfluoreszenz, die auch zur quantitativen Bestimmung des Reserpins herangezogen wird^{18,19)}, beruht, wie wir papierchromatographisch feststellen konnten, auf dem Entstehen des gleichen Oxydationsproduktes, das auch — neben anderen Reaktionsprodukten — aus Reserpin bei Säure- und Lichteinwirkung und beim Erhitzen in Formamid entsteht. Ein analoges Verhalten ist bei gleichen Versuchsbedingungen auch beim Rescinnamin zu beobachten. Die R_F -Werte des Reserpin-Oxydationsproduktes (RZ_1) sind ebenfalls in Tab. 1 verzeichnet.

Der einzige Fall, für den eine Fluoreszenzintensivierung notwendig erscheint, liegt vor, wenn man in einer Droge über die Anwesenheit von Deserpidin im Zweifel ist. Deserpidin hat unter den normalen Trocknungsbedingungen der Chromatogramme eine schwach bräunlich graue Fluoreszenz. Nach Besprühen mit Trichloressigsäure/Chloramin-Reagenz und Erhitzen auf 100° fluoresziert Deserpidin leuchtend graugrün. Die Fluoreszenz geht nach einigen Minuten in ein helles Blau über. Einen ähnlichen und meist ausreichenden Effekt erreicht man aber auch schon durch 10 Min. langes Erhitzen des Chromatogrammes auf 140°.

Die *Nachweisbarkeitsgrenzen* beim Bestrahlen mit langwelligem UV-Licht liegen für alle Rauwolfia-Alkaloide günstig. Sie sind noch in Konzentrationen von weniger als 1 µg/Fleck sichtbar. Im einzelnen wurden folgende Werte ermittelt:

- 0.02 µg: Serpentin, Alstonin, Serpentinaure, Alstoninsäure, RZ_1 .
- 0.05 µg: Reserpin, Rescinnamin, Reserpinin, Isoreserpin, Reserpsäure-methylester, Reserpsäure, Serpentinin.
- 0.1 µg: die Yohimbin-Isomeren, die meisten graugrün und gelbbraun fluoreszierenden Alkaloide des Tetrahydroserpentin-Typs.
- 0.5 µg: Deserpidin (nach stärkerem Erhitzen oder Besprühen mit Trichloressigsäure/Chloramin-Lösung: 0.05 µg).

Die Erfassungsgrenze der tertiären Indolin-Basen mit Perchlorsäure/Eisen(III)-chlorid-Reagenz liegt bei 2 bis 3 µg und die des Sarpagins mit konz. Salpetersäure bei 3 bis 5 µg.

Die zusätzliche Anwendung von Farbreagenzien erübrigt sich im allgemeinen, da die starken und charakteristischen Fluoreszenzen eine einfache und sichere Identifizierung erlauben. Außerdem sind nur wenige Reagenzien bekannt, die mit allen oder wenigstens den wichtigsten Rauwolfia-Alkaloiden brauchbare Färbungen geben. Hierzu gehören das für Phenole und andere reduzierende Stoffe benutzte Kalium-hexacyanoferrat(III)/Eisen(III)-chlorid-Reagenz²⁰⁾, das mit vielen Rauwolfia-Alkaloiden eine zwar empfindliche, aber unspezifische Blaufärbung bildet, ferner das bei der Papierchromatographie von Curare-Alkaloiden²¹⁾ verwendete Zimtaldehyd/Chlorwasserstoff-Reagenz, das rotviolette und bräunliche Farben hervorbringt.

16) L. DORFMAN, A. FURLNMEIER, C. F. HUEBNER, R. LUCAS, H. B. MACPHILLAMY, J. M. MUELLER, E. SCHLITTLER, R. SCHWYZER und A. F. ST. ANDRÉ, *Helv. chim. Acta* **37**, 59 [1954].

17) E. B. DECHENE, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **44**, 657 [1955].

18) C. R. SZALKOWSKI und W. J. MADER, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **45**, 613 [1956].

19) D. BANES, J. WOLFF, H. O. FALLSCHEER und J. CAROL, *J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit.* **45**, 708, 710 [1956].

20) G. M. BARTON, R. S. EVANS und J. A. F. GARDNER, *Nature [London]* **170**, 249 [1952].

21) TH. WIELAND und H. MERZ, *Chem. Ber.* **85**, 731 [1952].

Zur Aufklärung und Identifizierung von Komponenten so komplizierter Gemische, wie sie die Extrakte von Rauwolfia-Drogen darstellen, ist es häufig erwünscht, bestimmte Bereiche eines Standardchromatogramms weiter auseinanderzuziehen. Betrachtet man Gemisch A als ein solches Standardlösungsmittel, dann kann man die damit entwickelten Chromatogramme in drei Schwerpunktzonen von Alkaloiden einteilen:

Bereich a umfaßt alle Substanzen in Startnähe mit R_F 0 bis 0.05.

Bereich b, der alle Yohimbin-Isomeren und noch eine mehr oder weniger große Anzahl von bekannten und unbekanntem Alkaloiden umfaßt, liegt zwischen R_F 0.05 und 0.55.

Bereich c enthält alle übrigen Alkaloide — bekannte und unbekannt —, die oberhalb des Reserpins mit R_F 0.55 bis 1 liegen.

Der c-Bereich kann nun mit Gemisch B auf R_F -Werte zwischen 0.3 und 1 verteilt werden, wobei größere Abstände zwischen den einzelnen Alkaloidflecken erreicht werden. Besonders günstig verläuft die Trennung der fünf am stärksten lipophilen Alkaloide, wenn man das Papier statt mit Formamid allein mit einer Mischung von Formamid und Dimethylformamid behandelt (F-DMF-Imprägnierung) und mit Gemisch B entwickelt. Man erhält dann folgende R_F -Werte: Tetrahydroalstonin 0.68, Aricin 0.57, Reserpinin 0.51, Ajmalicin 0.43, Isoreserpin 0.30.

Der b-Bereich, der in allen Rauwolfia-Arten die größte Anzahl von Alkaloiden enthält, wird mit Gemisch D und besonders weit mit Gemisch E auseinandergezogen. Diese Trennung ist besonders wichtig, weil in diesem Bereich in vielen Rauwolfia-Arten noch bis jetzt nicht isolierte Alkaloide vorhanden sind. Die wichtigsten Alkaloide des a-Bereiches, Serpentin, Alstonin, Serpentinin und Sarpagin, wandern ebenfalls in den Fließmitteln D und E.

Bereich a enthält aber noch Komponenten, die in Papierchromatogrammen aller 5 Gemische A bis E auf dem Startpunkt zurückbleiben. Diese können mit Lösungsmittelgemischen auf Wasserbasis zum Wandern gebracht werden. Wir verwenden hierfür vor allem das System Methyläthylketon/Methylglykol/Wasser (30:2:7) (Gemisch F). Schneidet man z. B. aus mit Gemisch A entwickelten Chromatogrammen eines Extraktes aus *Rauwolfia serpentina* die Startflecken aus, eluiert und chromatographiert nun das eingeeugte Eluat mit Gemisch F, so erhält man ein Chromatogramm, auf dem außer Serpentin noch 4 blau und 3 grün fluoreszierende Flecken zu sehen sind (Bereich a_1). Das gleiche Ergebnis erhält man auch beim direkten Chromatographieren eines Extraktes aus *R. serpentina* mit Gemisch F. Eine dieser Substanzen ist Serpentin-säure. Die anderen sind noch nicht bekannt. Es ist nicht sicher, ob es sich bei allen um Alkaloide handelt. Da sich jedoch die mit Gemisch F entwickelten Chromatogramme aller von uns untersuchten Rauwolfia-Arten unterscheiden, empfiehlt es sich, auch diesen a_1 -Bereich, zusammen mit den Standardchromatogrammen A bis E, zum Vergleich von Rauwolfia-Drogen heranzuziehen. Ein letztes Problem bedeutet die Trennung von Serpentin und Alstonin, die mit keinem der hier genannten Lösungsmittel gelingt. Zwar kommen die beiden Alkaloide nach unseren Beobachtungen in der glei-

chen Rauwolfia-Art nicht zusammen vor, doch ist es zur Beurteilung verschiedener Arten zuweilen vorteilhaft, wenn man sie unterscheiden kann.

Das Lösungsmittelgemisch, in dem Alstonin und Serpentin ausreichend verschiedene R_F -Werte besitzen, ist Isopropylalkohol/0.5 n NH_4OH (4:1) (Gemisch G). Zur sicheren Identifizierung läßt man auf dem mit Gemisch G zu entwickelnden Chromatogramm als Testsubstanz Serpentin oder einen Extrakt aus *R. serpentina* oder *R. canescens* mitlaufen.

Tab. 2. R_F -Werte der am besten wasserlöslichen Rauwolfia-Alkaloide

Alkaloid	$R_F \cdot 100$		Fluoreszenz 366 μ
	in Gemisch F	in Gemisch G	
Alstonin	85—F	74	blau
Serpentin	75—95	63	blau
Alstoninsäure	45	39	blau
Serpentinsäure	32	31	blau
Reserpsäure	23	47	grün

Gemisch F: Methyläthylketon/Methylglykol/Wasser (30:2:7)

Gemisch G: Isopropylalkohol/0.5 n NH_4OH (4:1)

In den meisten der von uns untersuchten Rauwolfia-Arten findet sich eine der beiden Anhydronium-Basen als ein Hauptalkaloid vor. Ausnahmen sind *R. inebrians*, *R. cambodiana*, *R. manni*, *R. confertiflora* und *R. macrophylla*. Sie enthalten weder Serpentin, noch Alstonin.

Die papierchromatographische Trennung ermöglicht eine quantitative Bestimmung einzelner Alkaloide direkt im Drogenextrakt. So messen wir die therapeutisch wichtigen Alkaloide Reserpin und Rescinnamin spektrophotometrisch in den Elutionslösungen der getrennt oder zusammen ausgeschnittenen Flecken aus mit Gemisch C bzw. B entwickelten Chromatogrammen.

Serpentin und Ajmalin werden auf gleiche Weise in den Fleckausschnitten der mit den Gemischen E und D hergestellten Chromatogramme gemessen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Apparatur und Lösungsmittel: Als Chromatographiergefäße werden Glaszylinder mit verstellbarer Aufhängevorrichtung nach H. HELLMANN²²⁾ (35 cm hoch, 13 cm Durchmesser) verwendet, worin zwei Chromatogramme, die zusammen 8 bis 10 Substanzen oder Extrakte aufnehmen können, gleichzeitig entwickelt werden. Hat man viele Substanzen zu chromatographieren, so ist es empfehlenswert, entsprechend mehr Glaszylinder einzusetzen. Man kann zwar auch größere Entwicklungskammern, z. B. Aquarien von 33 cm Länge, 26 cm Tiefe und 30 cm Höhe, verwenden, muß dann aber mit größeren Schwankungen der R_F -Werte rechnen.

Die Lösungsmittelsysteme werden durch Mischen der Komponenten im jeweils erforderlichen Verhältnis hergestellt. Den Gemischen A bis E wird die gerade zur Sättigung notwendige Menge Formamid zugesetzt.

²²⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **288**, 95 [1951].

Vorbereiten der Chromatogramme: Die Papierstreifen werden in eine dicht verschließbare Wanne aus nichtrostendem Stahl eingelegt, in der sich für die Formamidimprägnierung eine Lösung von 20% Formamid in Aceton, für die F-DMF-Imprägnierung die Lösung Formamid/Dimethylformamid/Aceton (20:15:65) befindet. Sie sollen von der Flüssigkeit vollständig bedeckt sein. Nach genau 2 Min. werden die Streifen herausgenommen, zwischen Filtrierpapier schnell abgepreßt und kurze Zeit an der Luft aufgehängt. Diese Arbeitsweise muß genau eingehalten werden, weil die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte u. a. vom Grad der Formamidsättigung abhängig ist. Die Wanderung der Alkaloide wird außerdem merklich vom Wassergehalt der Chromatogramme beeinflusst. Dies macht sich besonders an Tagen mit sehr hohem Luftfeuchtigkeitsgehalt bemerkbar, da sich dann beim Abdunsten des Acetons größere Mengen Wasser auf dem Papier niederschlagen. Die dadurch auftretenden Störungen lassen sich jedoch beseitigen, wenn man die imprägnierten Streifen nach dem Verdampfen des Acetons und vor dem Auftragen der Substanzlösungen kurze Zeit in einen Trockenschrank von 80–100° hängt. Die Zeitdauer dieses „Entwässerungsvorganges“ muß sich nach der Höhe des Luftfeuchtigkeitsgehaltes richten. Sie liegt im allgemeinen zwischen 30 und 60 Sek. Zu beachten ist dabei, daß kein Formamid verdampft. Man öffnet daher während dieser Zeit den Trockenschrank zweimal und beobachtet, ob sich Formamiddampf bildet. Wir schalten diese Vortrocknung grundsätzlich — auch bei „trockener Atmosphäre“ — ein, weil erfahrungsgemäß unter diesen Bedingungen die schärfsten Trennungen zu erreichen sind. Wahrscheinlich bewirkt das Erhitzen des formamidfeuchten Papiers eine leichte Nachquellung der Cellulosefasern, ein tieferes Eindringen des Formamids in die Faserhöhlräume und vielleicht die Ausbildung eines Cellulose-Formamid-Komplexes ähnlich dem Cellulose-Wasser-Komplex, wie er bei der Papierchromatographie auf Wasserbasis angenommen wird. F-DMF-Chromatogramme werden nicht vorgetrocknet.

Die vorgetrockneten Chromatogramme sollen dann ohne größere Verzögerung mit den Substanzen beschickt und entwickelt werden.

Chromatographie: Alkaloidgemische, Drogenauszüge und Reinsubstanzen werden in Methanol, Chloroform oder Methanol/Chloroform (1:1) gelöst und je nach Konzentration der Lösungen mit einer Mikropipette in Anteilen von 2 bis 10 μ l auf die vorgezeichneten Startpunkte aufgetragen. Reinalkaloide geben die günstigsten Fleckengrößen im Bereich zwischen ihren Erfassungsgrenzen (vgl. S. 283) und etwa 20 μ g. Von Drogenextrakten setzt man 100 bis 300 μ g auf. Die aufzutragende Menge wird sich im allgemeinen nach dem Alkaloidgehalt der Droge richten. Darauf werden die Chromatogramme in die Glaszylinder gehängt, deren plangeschliffene Deckel mit Siliconfett abgedichtet werden. Chromatographiert wird ohne längere Gleichgewichtseinstellung bei einer Temperatur von $22 \pm 2^\circ$. Niedrigere Temperaturen bewirken Verlangsamung des Fließmittellaufes ohne bedeutende Beeinträchtigung der R_F -Werte, während höhere Temperaturen zu weitgehend veränderten R_F -Werten führen. Die in den Glaszylindern den Boden etwa 1 cm hoch bedeckenden Lösungsmittelgemische sollen möglichst nach zwei- bis dreimaliger Verwendung erneuert werden. Die Ammoniak-Atmosphäre für die Gemische D bis E wird durch Einstellen eines mit 10 ccn konz. Ammoniak gefüllten Präparatglases von 2 cm Öffnungsdurchmesser gebildet. Die entwickelten Chromatogramme sollen das Ammoniakgefäß nicht berühren. Wenn das Lösungsmittel den oberen Papierrand erreicht hat, was je nach Art des Lösungsmittels und der Größe der Streifen 3 bis 5 Stdn. dauert, werden die Chromatogramme herausgenommen und im Trockenschrank mit Umluft bei etwa 120° vom Lösungsmittel und dem größten Teil des Formamids befreit. Die stärksten Fluoreszenzen und die in Tab. 1 verzeichneten Fluoreszenzfarben erhält man, wenn die Chromatogramme nicht vollständig trocken sind. Die Trocknungszeit ist von der Temperatur des Trockenschrankes, der Belüftung und der Anzahl der Chromatogramme abhängig. Sie wird meist bei 3 bis 5 Min. liegen. Sollen Chromatogramme mit konz. Salpetersäure oder

mit Perchlorsäure/Eisen(III)-chlorid-Reagenz behandelt werden, so müssen sie vorher vollständig getrocknet werden. Man trocknet dann entweder nach der Markierung der Fluoreszenzflecken im UV-Licht noch einmal nach oder fertigt besser von vornherein gleich mehrere Chromatogramme an, weil durch das Besprühen mit den Reagenzien die Fluoreszenzen gestört werden.

Nachweis der Alkaloide

Fluoreszenz: Die Chromatogramme werden nacheinander mit der Quarz-Analysenlampe (366 m μ) und mit einer UV-Lampe *), die die Quecksilberlinie von 254 m μ aussendet, bestrahlt. Die meisten Alkaloide fluoreszieren mit charakteristischen Farben. Die Fluoreszenzflecken können markiert werden. Sie sind jedoch jahrelang haltbar, ohne sich wesentlich zu verändern. (Einzelheiten siehe Tab. 1 und Text S. 279–283). Zur Intensivierung mancher Fluoreszenzen, besonders der des Deserpidins, wird mit einem Gemisch aus 15 Teilen 25-proz. Trichloressigsäure in Äthanol und 1 Teil 3-proz. wäbr. Chloraminlösung besprüht und 1 Min. auf 100° erhitzt.

Farbreaktionen

1. **Perchlorsäure/Eisen(III)-chlorid-Reagenz:** Die gut getrockneten Chromatogramme werden mit einem Gemisch aus 100ccm 5-proz. HClO₄-Lösung und 2ccm 0.05 m FeCl₃-Lösung besprüht. Diese Reagenzlösung ist längere Zeit stabil. Die roten und violetten Färbungen der tert. Indolin-Basen erscheinen sofort, verblassen aber — je nach Konzentration der Alkaloide/ Fleck — nach einigen Min. bis einigen Stdn.

2. **Zimtaldehyd/Chlorwasserstoff-Reagenz:** Nach Besprühen der Chromatogramme mit einer 1-proz. methanol. Zimtaldehydlösung und Einhängen in ein mit Chlorwasserstoff gefülltes Gefäß bilden sich folgende Färbungen aus:

Violett: Ajmalin, Iso-ajmalin, Rauvomitin.

Blauviolett, Umschlag nach Blaugrau: Reserpin, Reserpinin, Rescinnamin, Reserpsäure, Reserpsäure-methylester.

Blauviolett, Umschlag nach Braunoliv: Vomalidin.

Hellbraun: Reserpilin, Isoreserpilin, Sarpagin.

Olivgrün: Yohimbin-Isomere, Ajmalicin.

Grauliv: Isorauhimbין, Seredin.

*) Spezial-Analysenlampe PL 320 der Quarzlampen-Gesellschaft, Hanau.