

Authentisches Py-tetrahydro-alstonin stimmte in Smp., Drehwerten und UV-Absorptionsspektrum mit unseren beiden Hydrierungsprodukten überein; Misch-Smp. aller drei Produkte ohne Depression.

Die Mikroanalysen wurden in den mikroanalytischen Laboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft* (Dr. *Gysel*) ausgeführt. Die Spektren verdanken wir den Herren Dr. *Gysel* (*CIBA AG.*) und P.-D. Dr. *Günthard* (*ETH.*). Ferner sind wir der *CIBA AG.* für das Ausgangsmaterial und dessen Extraktion, sowie Herrn Dr. *R. C. Elderfield* für die Überlassung von Alstoninproben zu grossem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

Aus den Wurzeln, bzw. Rinden afrikanischer Rauwolfia-Arten (*R. vomitoria* und *R. obscura*) wurde Alstonin isoliert und durch kristallisierte Salze und Derivate charakterisiert.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

35. Über Steroide.

109. Mitteilung¹⁾.

Papierchromatographie von schwach polaren Steroiden

von **R. Neher** und **A. Wettstein**.

(14. XII. 51.)

Die von *R. Conden*, *A. H. Gordon* & *A. J. P. Martin*²⁾ entwickelte Methode der Papierchromatographie³⁾ findet mit ausgezeichnetem Erfolg Anwendung zur Trennung und Identifizierung von Aminosäuren, Zuckern und anderen wasserlöslichen Verbindungen. In ihrer ursprünglichen Form eignet sie sich aber nicht ohne weiteres für Steroide oder andere in Wasser schwer oder nicht lösliche Substanzen, da deren Verteilung zwischen der stationären wässrigen und der mobilen organischen Phase weitgehend zugunsten letzterer erfolgt. Die betreffenden Verbindungen bewegen sich deshalb hauptsächlich mit der Lösungsmittelfront.

Zwar hat man mit Hilfe wässriger, meist komplizierter Lösungsmittelsysteme versucht, gewisse Steroide zu chromatographieren⁴⁾⁵⁾⁶⁾; eine wirksame Trennung konnte

¹⁾ 108. Mitteilung, *Helv.* **34**, 2286 (1951).

²⁾ *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).

³⁾ Übersichten: *A. J. P. Martin*, *Ann. Rev. Biochemistry* **19**, 517 (1950); *R. T. Williams* & *R. L. M. Synge*, Ed., *Biochemical Society Symposia No. 3, Partition Chromatography*, Cambridge, University Press 1950; *F. Cramer*, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1952.

⁴⁾ *J. M. McMahon*, *R. B. Davis* & *G. Kalinsky*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **75**, 799 (1950).

⁵⁾ *J. F. Nyc*, *J. B. Garst*, *H. F. Friedgood* & *D. M. Maron*, *Arch. Biochem.* **29**, 219 (1950).

⁶⁾ *A. C. Haskin*, *A. J. Shermann* & *W. M. Allen*, *J. Biol. Chem.* **182**, 429 (1950). In diesem Falle handelt es sich lediglich um eine Trennung von Progesteron und Sesamöl.

aber im allgemeinen nicht erreicht werden. Dies war lediglich bei phenolischen Steroiden möglich, indem sie als Azo-Derivate¹⁾ zur Chromatographie gelangten, oder bei wasserlöslichen Digitalisglykosiden²⁾. Ein weiterer Vorschlag ging dahin, Ketosteroide erst mit *Girard's* Reagens T in ihre wasserlöslichen Hydrazone überzuführen und letztere dann auf Papier mit n-Butanol-Wasser zu entwickeln³⁾. Dieses Verfahren entsprach aber den gestellten Anforderungen nicht.

Erst die Anwendung imprägnierter Papiere hat dann bei der Chromatographie vieler in Wasser schwer löslicher Substanzen zum Erfolg geführt. Je nach den gewählten Imprägnierungs- und Lösungsmitteln sowie den eingesetzten Substanzen erreichte man eine Trennung entweder durch Adsorption (A), durch Verteilung (V) zwischen zwei Phasen oder aber durch Kombination beider Prinzipien. Im Falle der Verteilung erfolgte diese nicht wie bei der üblichen Papierchromatographie, sondern zwischen stationärer organischer und mobiler wässriger oder ebenfalls organischer Phase. Dabei unterschieden sich die organischen Phasen durch relativ polaren und unpolaren Charakter.

Als Imprägnierungsmittel wurden u. a. vorgeschlagen: Aluminiumhydroxyd für Steroidhormone (A)⁴⁾; Stearinsäure-Chromtrichlorid-Komplex („Quilon“) (A, evtl. V) für Cholesterin und Cholestenon⁵⁾; Propylenglykol oder Formamid (V) für stark polare Steroide, wie Corticosteroide⁶⁾ 7), digitaloide Glykoside und Aglykone⁸⁾, und für phenolische Steroide⁹⁾; Äthylenglykol, Glycerin oder Caprylalkohol (V) für phenolische Steroide⁹⁾.

Von diesen und den bei anderen Verbindungsklassen bisher angewandten Imprägnierungsmitteln¹⁰⁾ haben sich bei uns zwar die polaren organischen Lösungsmittel, zusammen mit unpolaren Lösungsmitteln als mobile Phase, bei stark polaren Steroiden wie z. B. Corticosteroiden bewährt¹¹⁾. Im besonderen schätzen wir hier die Systeme Propylenglykol-Toluol und Formamid-Benzol-Chloroform⁶⁾ 7) 8). Mit allen erwähnten Systemen konnten wir hingegen keine wirksame Trennung einer Vielzahl von schwach polaren Steroiden bzw. entsprechenden Acetaten und Äthern erreichen. Gerade diese Aufgabe stellte sich uns im Zusammenhang mit der Untersuchung der Oxydationsprodukte von Cholesterylacetat-dibromid. Unter den bei stark polaren Steroiden angezeigten Bedingungen wanderten aber z. B. Cholesterylacetat, Δ^5 -Norcholesten-3 β -ol-25-on-acetat, Δ^5 -Pregnen-3 β -ol-20-on-acetat oder 3 β -Dehydro-androsteron-acetat regelmässige

¹⁾ E. Heftmann, *Science* **111**, 571 (1950); *Am. Soc.* **73**, 851 (1951).

²⁾ A. B. Svendsen & K. B. Jensen, *Pharm. acta Helv.* **25**, 241 (1950); C. H. Hassall & S. L. Martin, *Soc.* **1951**, 2766.

³⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, *J. Biol. Chem.* **177**, 109 (1949).

⁴⁾ I. E. Bush, *Nature* **166**, 445 (1950).

⁵⁾ D. Kritchevsky & M. Calvin, *Am. Soc.* **72**, 4330 (1950).

⁶⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, *Science* **111**, 6 (1950).

⁷⁾ R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).

⁸⁾ O. Schindler & T. Reichstein, *Helv.* **34**, 108 (1951).

⁹⁾ R. J. Boscott, *Biochem. J.* **48**, XLVII (1951).

¹⁰⁾ Vgl. die zitierten Übersichten.

¹¹⁾ R. Neher & A. Wettstein, *Helv.* **34**, 2278 (1951).

mit der Lösungsmittelfront. Um eine bessere Verteilung derartiger schwach polarer Steroide herbeizuführen, suchten wir deshalb für die stationäre Phase nach einem Lösungsmittel, das schwächer polar als Propylenglykol oder Formamid, trotzdem aber mit der unpolaren mobilen Phase nicht mischbar sei. Von vielen geprüften Verbindungen lieferte insbesondere der Äthylenglykol-monophenyläther¹⁾ (im weiteren als Glykoläther bezeichnet) vorzügliche Chromatogramme. Diese wurden auf dem mit Glykoläther imprägnierten Papier durch n-Heptan, gegebenenfalls auch durch Hexan, Ligroin (Kp. 120°), Cyclohexan oder Dekalin absteigend entwickelt. Bemerkenswerterweise ist der Glykoläther weder mit diesen unpolaren Lösungsmitteln noch mit Wasser unbeschränkt mischbar.

Ein besonderes Problem bildet jeweils der Nachweis der verschiedenen Verbindungen auf den entwickelten Chromatogrammen. Über Farbreaktionen mit Steroiden und insbes. Corticosteroiden im Papierschichtchromatogramm haben wir erst kürzlich ausführlich berichtet²⁾. Im vorliegenden Falle, wo es sich u. a. um den Nachweis von Cholesterylacetat und seinen Oxydationsprodukten handelte, benutzten wir zweckmässig die besonders für 5,6-ungesättigte Steroide als geeignet befundene Antimontrichlorid-Reaktion, mit welcher charakteristische, im weissen und UV.-Licht sichtbare Farben erhalten werden³⁾. So liessen sich z. B. von 3 β -Dehydro-androsteronacetat auf unbehandeltem Papier bis zu 1 γ , im Chromatogramm nach Entwicklung 3—5 γ noch gut nachweisen.

Von den anderen, ebenfalls durch uns schon früher auf Papierchromatogrammen benutzten Farbreaktionen haben sich erneut in vielen Fällen diejenigen mit 15-proz. Phosphorsäure und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure (modifizierte *Kägi-Miescher*-Reaktion) bewährt. Brauchbare Resultate erhielten wir weiter bei der Anwendung der für denselben Zweck vorgeschlagenen Reaktion mit Antimonpentachlorid⁴⁾. Schliesslich gelang die Übertragung der Farbreaktion mit Zinkchlorid-Benzoylchlorid⁵⁾ und des altbekannten *Legal-Testes*⁶⁾ für Steroide mit α, β -ungesättigter Lactongruppe auf Papierschichtchromatogramme. Die vielen anderen geprüften Indikatoren erwiesen sich als unempfindlich, irreführend oder sonst schlecht verwertbar.

¹⁾ Im Handel erhältlich z. B. als Phenylcellosolve der Carbide & Carbon Chemicals Corporation, New York.

²⁾ R. Neher & A. Wettstein, *Helv.* **34**, 2278 (1951).

³⁾ Vgl. Fussnote ²⁾, S. 2282, Tab. 3 (Farbreaktionen auf unbehandeltem Papier!).

⁴⁾ J. M. McMahon, R. B. Davis & G. Kalinsky, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **75**, 799 (1950).

⁵⁾ A. L. Bernoulli, *Helv.* **15**, 274 (1932); G. Pincus, G. Wheeler, G. Young & P. A. Zahl, *J. Biol. Chem.* **116**, 262 (1936). Vgl. auch die ähnliche Reaktion mit Zinkchlorid allein, J. F. Nyc & Mitarb., loc. cit.

⁶⁾ E. Legal, *Jahresber. Fortschritte der Chemie* **1883**, 1648.

Im folgenden sind einige Ergebnisse der Papierchromatographie mit dem System Glykoläther-Heptan aufgeführt. Fig. 1 zeigt die Auftrennung eines künstlichen Gemisches von je 50 γ Cholesterylacetat und einiger seiner Oxydationsprodukte (Nrn. 1–6, vgl. Tab. 1) auf *Whatman*-Papier Nr. 7 durch 2stündige, absteigende Entwicklung, d. h. bis die mobile Phase das untere Papierende erreicht hatte. Bei Fig. 2 wurde in gleicher Anordnung 7 Std. lang chromatographiert. Hierbei teilten sich die langsam wandernden Verbindungen 1–4 noch besser auf, während die schneller wandernden Verbindungen 5 und 6 das Papier am unteren Ende mit der mobilen Phase bereits verlassen haben. Nach 24 Std. befand sich schliesslich nur noch das Lacton-acetat 1 auf dem Chromatogramm. Mit dieser Methode konnten im Neutralteil von der Chromsäure-Oxydation des Cholesterylacetat-dibromides ausser den oben erwähnten 6 bekannten weitere 23, vorläufig unidentifizierte Verbindungen mit Antimontrichlorid nachgewiesen werden.

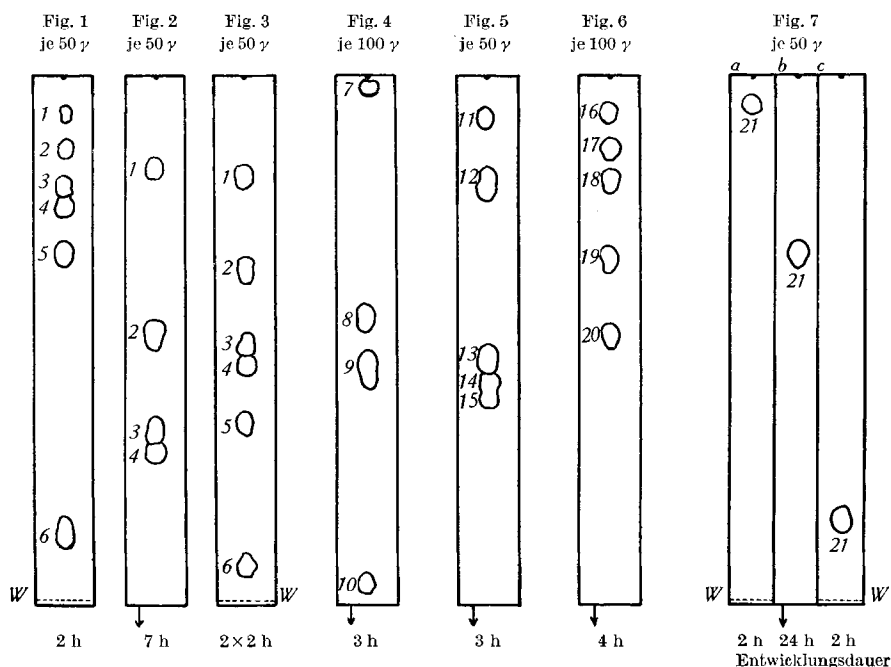


Fig. 1—6, 7a und 7b Glykoläther/Heptan, *Whatman*-Papier Nr. 7, absteigend

Fig. 7c Propylenglykol/Toluol, *Whatman*-Papier Nr. 7, absteigend

W = Wanderungsgrenze der mobilen Phase, Nrn. der Substanzen, s. Tab. 1.

↓ = Abtropfen der mobilen Phase nach Erreichen des Papierendes.

Indikator: Antimontrichlorid oder Zinkchlorid-Benzoylchlorid (vgl. Tab. 1).

Mit einer „multiplen“ eindimensionalen Chromatographiertechnik gelang es, die langsam wandernden Substanzen weiter auseinander zu ziehen und trotzdem die schneller laufenden auf dem

Tabelle 1.

| Nr. | Substanz, je 50 γ^1) auf unbehandeltem Papier ²⁾ | Farbreaktion mit | | | |
|-----|---|---|-----------------------|---|-----------------|
| | | Antimontrichlorid ³⁾ im weissen Licht | im UV.-Licht | Zinkchlorid- Benzoylchlorid ³⁾ im weissen Licht im UV.-Licht | |
| 1 | Δ^5 -3 β -Acetoxy-17-oxy-cholensäurelacton (24 \rightarrow 17) ⁴⁾ | graubraun | braun | violett-braun | grau |
| 2 | 3 β -Dehydro-androsteron-acetat | rostrot | orange | violett-braun | gelb-violett |
| 3 | Acetat des <i>Koester-Logemann</i> -Ketons | rot | rot | grünlich-braun | dunkelbraun |
| 4 | Δ^5 -Pregnen-3 β -ol-20-on-acetat | gelb-braun-grün ⁵⁾ | hellrot ⁵⁾ | braunviolett | dunkelbraun |
| 5 | Δ^5 -Norcholesten-3 β -ol-25-on-acetat | rotbraun | orange | violett | rostrot |
| 6 | Cholesteryl-acetat | hellbraun | rotorange | violett | rostrot |
| 7 | Δ^5 -Norcholesten-3 β -ol-25-on | rotviolett | rotviolett | violett | rostrot |
| 8 | Ergosterin | braun | rotorange | hellbraun | gelblich-grau |
| 9 | Stigmasterin | grau | rosa | violett | rostrot-violett |
| 10 | Cholesterin | grauviolett | rosa | violett | rostrot |
| 11 | Δ^5 -3 β -Acetoxy-14//15-chole-14-on-15,24-disäure- dimethylester ⁶⁾ | rotviolett | rotviolett | rotviolett | rostrot |
| 12 | Δ^5 -3 β -Acetoxy-ätioliensäure-dimethylester | rot | rostrot | grünlich-braun | gelbgrün |
| 13 | Δ^5 -3 β -Acetoxy-ätioliensäure-methylester | rostrot | braun | grün | hellgrau |
| 14 | Δ^5 -3 β -Acetoxy-ätioliensäure-methylester | graubraun | braun | violett | violett |
| 15 | Δ^5 -3 β -Acetoxy-bisnorcholensäure-methylester | rotviolett | rosa | violett | rostrot |
| 16 | Testosteron | rotviolett | rosa | violett | rostrot |
| 17 | Progesteron | — | hellrosa | grünlich-braun | gelbgrün |
| 18 | Androstan-3,17-dion | — | hellgrau | grün | grün |
| 19 | Equilenin-methyläther | — | graublau | orange | orange |
| 20 | Yamogemin-acetat | — | grau | rot | rot |
| 21 | Δ^5 -Pregnen-3 β -ol-20-on | orange | orange | rot-violett | violett |
| | | rotbraun | braun | braun-violett | dunkelbraun |

¹⁾ Durch Änderung der Konzentration tritt bei den meisten Verbindungen leichte Farbverschiebung auf. Vgl. Helv. 34, 2282 (1951), wo die Farbreaktion von je 100 γ einiger dieser Substanzen mit Antimontrichlorid auf unbehandeltem Papier angeführt ist. ²⁾ Lediglich bei Nr. 3 finden sich erhebliche Unterschiede in den SbCl₃-Farbreaktionen auf unbehandeltem Papier und auf dem getrockneten Glykoläther-Heptan-Chromatogramm. ³⁾ Bei längerem Kontakt der Papiere mit der Luft verschoben sich die Farben gegen violett (Antimontrichlorid) bzw. gegen grün (Zinkchlorid-Benzoylchlorid) und verblassen allmählich. ⁴⁾ J. R. Billetter & K. Miescher, Helv. 32, 564 (1949). ⁵⁾ Im getrockneten Glykoläther-Heptan-Chromatogramm. ⁶⁾ P. Wieland & K. Miescher, Helv. 31, 211 (1948).

Chromatogramm zu behalten, wie Fig. 3 zeigt. Wir entwickelten dabei dasselbe Gemisch von Verbindungen 1–6 wie bei Fig. 1 zunächst 2 Std. lang (mobile Phase am unteren Rand), hängten dann das Papier an die Luft und liessen lediglich das Heptan verdunsten. Hierauf setzte man das entwickelte Chromatogramm neuerdings in den Trog ein und liess die mobile Phase ein zweites Mal bis zum Rand absteigen. Je nach Anzahl und Art der zu trennenden Substanzen kann diese Operation öfters wiederholt werden, wodurch der Platz auf der Papierbahn besser ausgenützt wird.

Aus Fig. 1–3 ist weiterhin ersichtlich, dass sich die Steroidacetate 3 und 4 nicht völlig voneinander trennen liessen. Dies bot jedoch keine Schwierigkeit für ihre Erkennung, da sich die betreffenden Antimontrichlorid-Reaktionen auf dem fertigen Chromatogramm deutlich in der Farbe unterschieden (grün bzw. rotbraun). Auf die Bestimmung von R_F -Werten wurde grundsätzlich verzichtet. Man achtet besser auf die relative Lage der Flecken und chromatographiert bei unbekanntem Gemischen parallel bekannte Vergleichssubstanzen. Dies ist auch deshalb von Vorteil, weil die Wandergeschwindigkeiten trotz sorgfältiger Standardisierung der chromatographischen Technik (siehe experimenteller Teil) nicht immer ganz konstant gehalten werden können.

Fig. 4 zeigt die Auftrennung des Gemisches einiger freier Sterine und von Δ^5 -Norcholesten-3 β -ol-25-on, Fig. 5 ein Chromatogramm mit verschiedenen Acetoxysteroid-säureestern. Hierbei wanderten die homologen Verbindungen 14 und 15 praktisch gleich weit. Das Verhalten einer Reihe etwas stärker polarer Steroide, wie Testosteron (16), Progesteron (17) usw., im Glykoläther-Heptan-Chromatogramm bei 24stündiger Entwicklung geht aus Fig. 6 hervor. Während hier einwandfreie Trennung erfolgte, war dies bei den stark polaren Corticosteroiden nicht mehr möglich; sie blieben am Startpunkt zurück.

Wie diese Beispiele zeigen, eignet sich in der Tat das System Glykoläther-Heptan in erster Linie zur Papierchromatographie von schwach polaren Steroiden, insbesondere also von gesättigten oder wenig ungesättigten und solchen Verbindungen, deren Hydroxyl- und Carboxylgruppen in veresteter oder verätherter Form vorliegen. Verbindungen mit stark polaren Gruppen oder vielen Doppelbindungen wandern in dieser Versuchsanordnung nur langsam und benötigen daher längere Zeit zur wirksamen Chromatographie (48 Std. und mehr). Die Systeme Glykoläther-Heptan einerseits und Propylenglykol-Toluol bzw. Formamid-Chloroform andererseits ergänzen sich demnach in idealer Weise, wenn man ersteres für schwächer, letztere für stärker polare Substanzen verwendet. Für gewisse Steroide von mittlerer Polarität, wie z. B. Δ^5 -Pregnen-3 β -ol-20-on (vgl. Fig. 7a–c), konnten wir bei richtiger Wahl der Entwicklungszeit sowohl das eine als auch das andere Verfahren heranziehen. Hoch-

polare Steroide wie Cholsäure wandern innerhalb normaler Entwicklungszeiten auch im Propylenglykol-Toluol-System nicht mehr nennenswert. Bei diesen Verbindungen lassen sich bereits die üblichen wässrigen Lösungsmittelgemische benutzen.

Experimenteller Teil.

Papierchromatographische Technik. Für die Chromatographie mit dem System Äthylenglykol-monophenyläther und Heptan verwendeten wir vorteilhaft *Whatman*-Papier Nr. 7. Mit den Papieren Nr. 1 und 4 benötigte man aus dem unten erwähnten Grund für den gleichen Trenneffekt etwa fünfmal so viel Zeit. Das Papier wurde in Form von Streifen oder Blättern, z. B. 8—30 cm breit und 30—54 cm lang, bis auf einen schmalen oberen Rand mit reinem, unter vermindertem Druck des tillierten Glykoläther getränkt und hernach in einer Stockpresse dreimal 3 Min. zwischen weichem Filterpapier abgepresst, wobei man letzteres vor jeder Pressung erneuerte. Die Imprägnierung betrug dann durchschnittlich 11,5% des Papiergewichtes. Da der Verteilungskoeffizient und damit die Wandergeschwindigkeit einer Substanz natürlich stark von der Menge des Glykoläthers abhängt, ist darauf zu achten, dass man die Imprägnierung stets in gleicher Weise ausführt. Besonders bei grösseren Bögen ist es wichtig, dass diese an allen Stellen gleich stark ausgepresst werden. Wenn wir die *Whatman*-Papiere Nr. 1 und 4 unter den gleichen Bedingungen behandelten, so nahmen sie infolge ihrer dichteren Struktur ca. 15% ihres Gewichtes an Glykoläther auf, was eine starke Verminderung der Wandergeschwindigkeit verursachte. Für letztere besteht im Fall von *Whatman* Nr. 7 nur ein minimaler Unterschied zwischen der Entwicklung in Quer- oder Längs-Richtung (Maschinen-Richtung) der Papierbögen; die besten Chromatogramme erhielten wir, wenn in Querrichtung entwickelt wurde.

Man liess die imprägnierten Papiere nicht unnötig lange an der Luft liegen, vor allem, wenn diese einen hohen Feuchtigkeitsgehalt aufwies. Feuchtigkeit im System Glykoläther-Heptan bewirkte, dass die Steroide wesentlich schneller wanderten, dabei aber verwaschen und unsauber getrennt wurden. Aus diesem Grunde erwies sich die vereinfachte Imprägnierungsmethode, wobei die Papiere in eine 10-proz. Lösung des Glykoläthers in Aceton getaucht und dann bis zur Verflüchtigung des Acetons an die Luft gehängt wurden, bei hoher Luftfeuchtigkeit als unzweckmässig. Wenn daher kein Raum mit konditionierter Luft zur Verfügung steht, ist eine korrekte Imprägnierung nur nach der erstgenannten Methode zu erzielen.

Die Substanzen oder Extrakte wurden wie üblich in Form von frischen Lösungen¹⁾ auf eine möglichst kleine Fläche des imprägnierten Papieres an den Startpunkten aufgetropft, die sich ca. 8 cm unterhalb des oberen Randes in seitlichen Abständen von je 2,5 cm befanden. Hierbei war es nicht nötig, schmale, voneinander getrennte Streifen zu verwenden; man konnte ebenso gut auf grossen Blättern chromatographieren.

Wir entwickelten absteigend in Glasgefässen, die oben plan geschliffen und mit Glasplatten und Siliconfett gut abgedichtet waren. Als mobile Phase diente in den meisten Fällen reines, trockenes n-Heptan, das bei der Arbeitstemperatur von $23^{\circ} \pm 3^{\circ}$ mit reinem Glykoläther gesättigt wurde, d. h. 1,3—1,4% davon enthielt. Um gut reproduzierbare Wandergeschwindigkeiten zu erzielen, hat man ausser auf Temperatur-Konstanz u. a. darauf zu achten, dass die genau horizontal ausgerichteten Tröge zu Beginn einer Chromatographie immer gleich hoch mit der mobilen Phase angefüllt werden. Für längere Entwicklungszeiten empfiehlt sich die Anwendung einer automatischen Nachfüll-Vorrichtung. Ferner erwies sich die völlige Sättigung der Atmosphäre im Chromatographiergefäss mit Lösungsmitteldämpfen als sehr wichtig, was dadurch erreicht wurde, dass sich an den Seitenwänden befindliche Filterpapiere vom Gefässboden aus mit überschüssiger mobiler Phase vollsaugten. Das Lösungsmittel legte in unserem Falle bei absteigender Chromatographie in 2 Std. einen Weg von etwa 45 cm zurück; sobald es vom unteren Rand abtropfte, ging die Entwicklung etwas schneller vor sich.

¹⁾ Alte Lösungen können durch oxydative oder andere Veränderungen der Substanzen ein ganz falsches Bild im Chromatogramm hervorrufen.

Nach der Entwicklung wurden die Papiere zur Entfernung des Heptans kurz an der Luft und hierauf 20 Min. bei 90° im Trockenschrank mit gutem Abzug getrocknet. Der Glykoläther verflüchtigte sich hierbei fast vollständig, so dass er die Ausführung der Farbreaktionen nicht mehr beeinflusste (mit Ausnahme der Antimontrichlorid-Reaktion des *Koester-Logemann-Ketoacetates*; vgl. Tab. 1).

Ausser den Systemen von Glykoläther mit Heptan und anderen Lösungsmitteln als mobiler Phase wurde eine Reihe anderer nur beschränkt mischbarer Systeme für die Papierchromatographie von Steroiden untersucht. Im folgenden ist stets zuerst das Imprägnierungsmittel, dann das mobile Lösungsmittel genannt: Äthylenglykol-Toluol; Äthylenglykol-monomethyläther-Hexan oder -Dekalin; Äthylenglykol-mono-m-kresyläther-Heptan; Äthylenglykol-monobenzyläther-Heptan; Äthylenchlorhydrin-Heptan; Diäthylenglykol-Toluol; Propylenglykol-Chlorbenzol bzw. -Hexan, -Heptan, -Cyclohexan, -Äthylenchlorid, -Tetralin oder -Dekalin; Glycerin-Toluol; Butylenglykol-Toluol bzw. -Heptan oder -Äthylenchlorid; Nitromethan-Heptan oder -Cyclohexan; Formamid-Heptan bzw. -Cyclohexan, -Äthylenchlorid, -Tetralin oder -Dekalin; Benzylalkohol-Heptan. Aus dieser Reihe haben sich insbesondere die Systeme Propylenglykol-Chlorbenzol bzw. -Äthylenchlorid als Übergänge zwischen den beiden Systemen Glykoläther-Heptan und Propylenglykol-Toluol bewährt.

Indikatoren. Über die Ausführung der Farbreaktionen von Steroiden auf Papier mit Antimontrichlorid (siehe auch Tab. 1), 15-proz. Phosphorsäure, Anisaldehyd-Schwefelsäure usw. vgl. *R. Neher & A. Wettstein*¹⁾. Es empfiehlt sich, möglichst frische Lösungen der reinen Reagentien anzuwenden.

Zinkchlorid-Benzoylchlorid: Die trockenen Chromatogramme wurden mit einer Lösung von 20 g wasserfreiem Zinkchlorid in 30 cm³ Eisessig mässig besprüht und 5 Min. auf 90° erhitzt. Bei einigen Verbindungen, wie Ergosterin, Δ^5 -Pregnen-3 β -ol-20-on, *Koester-Logemann-Keton* oder 17 α -Testosteron, erhielt man schon in diesem Stadium Färbungen. Darauf wurden die Papiere durch eine 50-proz. Lösung von Benzoylchlorid in Chloroform gezogen und nur kurz auf 90° erhitzt, so dass sich das Papier selbst noch nicht braun färbte. Die Mehrzahl der geprüften Steroide zeigte hernach im weissen und UV.-Licht sichtbare, kräftige Farben (vgl. Tab. 1).

Legal-Test: Die Chromatogramme wurden mit einer 1-proz. Lösung von Natriumnitroprussiat in 50-proz. alkoholischer n. Natronlauge besprüht, wodurch Steroide mit α , β -ungesättigtem Lactonring flüchtige, rot bis rotviolette Flecken auf weissem bis gelbem Grund ergaben.

Die hier erwähnten Farbreaktionen, welche ohne Verwendung wässriger Lösungsmittel ausgeführt werden, sind meist empfindlich gegenüber Feuchtigkeit, so dass die Farbnancen gelegentlich etwas verschoben werden bzw. stärker oder schwächer hervortreten.

Herrn *E. von Arx* danken wir für die technische Mithilfe bei der Ausführung der Versuche bestens.

SUMMARY.

A critical survey of the known methods of paper chromatography of steroids is given. A new solvent system is described which, in connection with several colour reactions, is particularly applicable to the separation, identification and purity analysis of *weakly polar steroids* or corresponding esters and ethers. The stationary phase is formed by ethyleneglycol monophenylether (phenylcellosolve) on *Whatman* paper No. 7, the mobile phase by heptane or a similar non-polar solvent.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

¹⁾ Helv. **34**, 2278 (1951).