

Zusammenfassung.

Durch Kondensation von Diacetyl mit Monoaldehyd-fumarsäuremethylester und Muconsäure-monoaldehyd-monomethylester wurden verschiedene Polyen-diketo-carbonsäureester dargestellt und ihre UV.-Absorptionsspektren verglichen.

Eine andere Gruppe von Polyen-diketonen liess sich durch Kondensation von Octadien-(3,5)-dion-(2,7) mit Zimtaldehyd bzw. Phenyl-pentadienal bzw. Phenyl-heptatrienal gewinnen. Auch deren Absorptionsspektren wurden aufgenommen und verglichen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

201. Zur papierchromatographischen Trennung der Mutterkornalkaloide.

35. Mitteilung über Mutterkornalkaloide¹⁾

von A. Stoll und A. Rüeegger.

(18. VIII. 54.)

Einleitung.

Gruppiert man die bis heute bekannten natürlichen Mutterkornalkaloide nach ihrer konstitutionellen Verwandtschaft, so ergibt sich die folgende Einteilung²⁾:

	Derivat der		nach Hydrolyse isolierbare Ketosaure	nach Hydrolyse isolierbare Aminverbindungen
	Lysergsäure	Isolysergsäure		
Ergotamin- gruppe	Ergotamin Ergosin	Ergotaminin Ergosinin	Brenztrauben- säure	L-Phenylalanin, D-Prolin L-Leucin, D-Prolin
Ergotoxin- gruppe	Ergocristin Ergokryptin Ergocornin	Ergocristinin Ergokryptinin Ergocorninin	Dimethyl- brenztrauben- säure	L-Phenylalanin, D-Prolin L-Leucin, D-Prolin L-Valin, D-Prolin
Ergobasin- gruppe	Ergobasin	Ergobasinin	—	2-Amino-propanol-(1)

Die nahe chemische Verwandtschaft hat sehr ähnliche physikalische Eigenschaften zur Folge, welche die Auftrennung von Gemischen in die Einzelalkaloide erschweren; sie geht daher oft mit beträchtlichem Substanzverlust einher. Dies gilt besonders für die

¹⁾ 34. Mitteilung, Helv. 37, 820 (1954).

²⁾ Siehe z. B. A. Stoll, Österr. Chemiker-Ztg. 53 73, 101 (1952).

Bestandteile des Ergotoxinkomplexes, der jahrzehntlang als einheitlicher Stoff betrachtet wurde, bis *Stoll & Hofmann*¹⁾ 1943 den Nachweis erbrachten, dass die Substanz aus drei Komponenten besteht, die Mischkristalle bilden.

Nach den überraschenden Erfolgen, zu denen die mit minimalen Substanzmengen arbeitende Papierchromatographie bei der Trennung von Naturstoffen in den letzten Jahren geführt hatte, schien es gegeben, die Anwendbarkeit dieser Methode auch auf dem Gebiet der Mutterkornalkaloide zu prüfen. Es ist denn auch bereits von anderer Seite über Versuche in dieser Richtung berichtet worden.

*Foster, Macdonald & Jones*²⁾ erreichten auf papierchromatographischem Wege die Abtrennung des Ergobasins und Ergobasinins aus dem Alkaloidgemisch. Auch die Komponenten der Ergotamin- und der Ergotoxingruppe identifizierten sie, indem sie die durch vollständige Hydrolyse aus dem Peptidteil der Alkaloide in Freiheit gesetzten spezifischen Aminosäuren³⁾ auf papierchromatographischem Wege bestimmten. *Carless & Woodhead*⁴⁾ arbeiteten mit Papier, das mit sauren Pufferlösungen vorbehandelt worden war; es gelang ihnen die Trennung von Ergotamin und Ergotaminin, sowie die Abtrennung des Ergocristinins aus dem Ergotoxinkomplex; die übrigen Ergotoxinalkaloide wanderten gemeinsam. *Brindle, Carless & Woodhead*⁵⁾ studierten den Effekt des pH bei der Verwendung gepufferter Papiere auf den RF-Wert der genannten Alkaloide und erweiterten die Methode in quantitativer Hinsicht. Das diesem Verfahren zugrunde liegende Prinzip wurde kürzlich durch *Carless*⁶⁾ auch auf Kolonnen mit Cellulosepulver übertragen; eine Auftrennung des Ergotoxins in seine Komponenten war indessen auch bei dieser Arbeitsweise nicht zu erreichen. *Tanaka & Sugawa*⁷⁾ untersuchten die Zusammensetzung der Alkaloidgemische aus Mutterkorn von verschiedenen Wirtspflanzen; zur Hauptsache identifizierten sie die Einzelalkaloide durch Bestimmung der bei der Hydrolyse freigesetzten Aminosäuren. *Tyler & Schwarting*⁸⁾ verwendeten in ihren Versuchen Papiere, die mit Propylenglykol, Formamid oder Siliconharz beladen waren; das Ergotoxin verhielt sich jedoch auch bei diesem Vorgehen wie eine einheitliche Substanz. *Fuchs & Pöhm*⁹⁾ analysierten das Ergotoxin ebenfalls indirekt durch Bestimmung der hydrolytisch abspaltbaren Aminosäuren. Dagegen berichtet *Berg*¹⁰⁾¹¹⁾ über eine erfolgreiche Trennung der intakten Ergotoxinkomponenten Ergocornin, Ergokryptin und Ergocristin. Dieses Ergebnis wurde erzielt mit Hilfe eines Benzol-Äthanol-Gemisches als mobiler Flüssigkeit auf mit Puffer vom pH 3,0 vorbehandeltem Papier. Einen guten Trenneffekt erhielten *Pöhm & Fuchs*¹²⁾ mit einem Gemisch aus Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform und Benzol als mobiler und mit Formamid, das 4% Benzoesäure enthielt, als stationärer Phase. In der Ergotoxingruppe bleiben bei dieser Arbeitsweise Ergocornin

1) *A. Stoll & A. Hofmann*, *Helv.* **26**, 1570 (1943).

2) *G. E. Foster, J. Macdonald & T. S. G. Jones*, *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 802 (1949)

3) Das auf der Bestimmung der bei der Hydrolyse frei werdenden Aminosäuren beruhende indirekte Verfahren wird auch in unserm Laboratorium seit längerer Zeit angewandt, speziell auch zur quantitativen Analyse der Komponenten im Hydergin.

4) *J. E. Carless & H. B. Woodhead*, *Nature* **168**, 203 (1951).

5) *H. Brindle, J. E. Carless & H. B. Woodhead*, *J. Pharm. Pharmacol.* **3**, 793 (1951).

6) *J. E. Carless*, *J. Pharm. Pharmacol.* **5**, 883 (1953).

7) *K. Tanaka & T. Sugawa*, *J. Pharm. Soc. Japan* **72**, 616 (1952).

8) *V. E. Tyler & A. E. Schwarting*, *J. Am. Pharm. Ass.* **41**, 354 (1952).

9) *L. Fuchs & M. Pöhm*, *Scientia pharmaceutica* **19**, 232 (1951).

10) *A. M. Berg*, *Pharm. Weekblad* **87**, 282 (1952).

11) *A. M. Berg*, *Diss. Univ. Utrecht* 1953.

12) *M. Pöhm & L. Fuchs*, *Naturwiss.* **41**, 63 (1954).

und Ergocristin einerseits und Ergocorninin und Ergocristinin andererseits ungetrennt. Ebenfalls mit Formamid, jedoch ohne Säurezusatz, als stationärer Flüssigkeit und mit Benzol oder Benzol-Chloroform als beweglicher Phase erreichten *Macek, Cerny & Semonsky*¹⁾ sowie *Macek*²⁾ ihr Ziel, das im Nachweis von Begleitalkaloiden in Ergotaminpräparaten bestand. Mit Hilfe eines Gemisches von Toluol, Petroläther und Methanol trennten schliesslich *Tuzson & Vastagh*³⁾ den nativen vom hydrierten Ergotoxinkomplex, jedoch ohne dass dabei die Komponenten der beiden Gemische einzeln zu Tage getreten wären.

2. Eigene Versuche.

Auf Grund von Erfahrungen, die wir in der papierchromatographischen Methodik seit längerer Zeit sammeln konnten, sind wir davon abgekommen, als mobile Phasen Gemische von Flüssigkeiten mit hohem Dampfdruck, wie sie einige der obengenannten Autoren verwenden, zu gebrauchen. Es ist aus verschiedenen Gründen nämlich schwierig, mit ihnen reproduzierbare Verhältnisse beim chromatographischen Prozess zu erhalten. Wir haben deshalb in anderer Weise versucht, die Trennung auch der sehr nahe verwandten Mutterkornalkaloide zu erreichen. Für Substanzen, die in Wasser schwer, in organischen Solventien jedoch leicht löslich sind, hat sich häufig, z. B. auch bei manchen Glykosiden und deren Abbauprodukten⁴⁾, die sogenannte „echte Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen“ als wirksam erwiesen. Bei dieser Modifikation der Papierchromatographie ist Wasser die mobile Phase, während das Papier mit einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Flüssigkeit – also nicht mit dem von *Tyler & Schwarting* verwendeten Siliconharz – beladen ist, die nun, umgekehrt wie bei der herkömmlichen Ausführung, die stationäre Phase darstellt. Für Mutterkornalkaloide ergab sich tatsächlich ein guter Trenneffekt, wenn als stationäre Flüssigkeit Phtalsäure-dimethylester zur Verwendung kam. Dem als mobile Flüssigkeit dienenden Wasser musste zur Erhöhung der Löslichkeit der zu trennenden Substanzen eine schwache Säure zugesetzt werden. Eine weitere Verbesserung erzielten wir dadurch, dass dem Wasser mehr oder weniger grosse Mengen Formamid zugesetzt wurden; die Säuremenge liess sich dadurch verringern, was zur Ausbildung von schärfer begrenzten Flecken führte. Als Säurekomponente benutzten wir die im Formamid üblicher Qualität auch nach dem Destillieren noch vorhandene Ameisensäure; nötigenfalls vergrösserten wir deren Konzentration durch weiteren Zusatz, oder wir verringerten sie durch teilweise Neutralisation mit Natronlauge. Als Mass für den Säuregehalt diente das potentiometrisch gemessene pH des Formamid-Wasser-Gemisches.

1) *K. Macek, A. Cerny & M. Semonsky, Pharmazie* **9**, 388 (1954).

2) *K. Macek, Pharmazie* **9**, 420 (1954).

3) *J. Tuzson & G. Vastagh, Pharm. acta Helv.* **29**, 118 (1954).

4) *R. Tschesche, G. Grimmer & Fr. Seehofer, B.* **86**, 1235 (1953).

Die Trennung der nicht hydrierten natürlichen Alkaloide kann durch ihre intensive blauviolette Fluoreszenz im UV.-Licht beobachtet werden. Im fertigen Chromatogramm werden die Basen mit ihrer blauvioletten Farbreaktion nach *Van Urk* mit p-Dimethylaminobenzaldehyd sichtbar gemacht (siehe Experimenteller Teil). Weniger als 1 γ Alkaloid kann auf diese Weise noch erfasst werden.

Es war nicht unser Bestreben, sämtliche sechs bisher bekannten Alkaloide des Mutterkorns und ihre Isomeren in einem einzigen Chromatogramm zu trennen. Dagegen sollte die Methode zur Analyse der bereits auf andere Weise getrennten konstitutionellen Hauptgruppen, die in der eingangs gegebenen Übersicht aufgeführt sind, herangezogen werden. Unser besonderes Interesse galt dabei dem Ergotoxinkomplex; aber auch die beiden andern Gruppen, sowie das Gemisch der hydrierten Komponenten des Ergotoxins, wie es z. B. im „Hydergin“ vorliegt, wurden in den Kreis der Untersuchung einbezogen. In allen Fällen erwies sich die Beladung des Papiers mit Phtalsäure-dimethylester als sehr geeignet. Die günstigste Ameisensäure-Konzentration und der Formamidgehalt der wässrigen Phase waren dagegen für die einzelnen Gruppen verschieden.

a) Die Ergotoxingruppe. Das positive Ergebnis der Versuche mit Ergotoxinpräparaten erscheint ganz besonders geeignet, die Leistungsfähigkeit unserer Methode zu veranschaulichen; denn nicht nur die drei Alkaloide Ergocornin, Ergokryptin und Ergocristin, sondern auch deren stereomere Umlagerungsprodukte Ergocorninin, Ergokryptinin und Ergocristinin erschienen, im Gemisch aufgetragen, auf dem Chromatogramm in sechs gut getrennten Flecken. Mobile Phase war dabei ein Gemisch von Formamid und Wasser im Volumverhältnis 4 : 6, dem soviel Ameisensäure beigemischt war, dass das pH 4,0 betrug. Fig. 1 gibt das Resultat eines Versuchs wieder, wobei zum Vergleich auch die einheitlichen Präparate allein aufgetragen und parallel zum Wandern gebracht wurden. Die gemessenen RF-Werte sind in der zusammenfassenden Tab. 1 aufgeführt.

Ausser den an sich gut ausgeprägten Flecken zeigen sich im gefärbten Chromatogramm schwache Streifen, die im Falle der Einzelsubstanzen nur knapp bemerkbar, beim Gemisch dagegen infolge ihrer Überlagerung stärker sichtbar sind. Die Tatsache, dass sie, anschliessend an die jeweiligen Flecken, im Falle der Lysergsäurederivate in der Richtung kleinerer RF-Werte liegen, bei den entsprechenden Stereomeren jedoch umgekehrt auf Spuren schneller wandernder Substanzen hinweisen, erlaubt ihre Deutung: Die Lysergsäureverbindungen unterliegen während ihrer Wanderung in geringem Masse der Umlagerung in die Derivate der Isolysergsäure und umgekehrt, ein Vorgang, der auch an stehenden Lösungen von Mutterkornalkaloiden beobachtet wird.

b) Die Ergotamingruppe. Auch in diesem Falle konnte eine vollständige Trennung der vier Komponenten Ergotamin, Ergosin, Ergotaminin und Ergosinin erzielt werden. Das Volumverhältnis Formamid-Wasser war dabei wie im Falle des Ergotoxins 4 : 6; das für den Trenneffekt günstigste pH betrug jedoch 5,2. Fig. 2 zeigt das chromatographische Bild; die Tab. 1 enthält die RF-Werte auch dieser Gruppe. Die beim Ergotoxin beschriebene spurenweise Umlagerung konnte auch in dieser Gruppe beobachtet werden.

Tabelle 1.
RF-Werte¹⁾.

	Zusammensetzung der wässrigen Phase und ihr mit Ameisensäure eingestelltes pH	RF-Wert
Ergocornin	Formamid-Wasser 4:6 (v/v) pH: 4,0	0,73
Ergokryptin		0,63
Ergocristin		0,51
Ergocorninin		0,35
Ergokryptinin		0,25
Ergocristinin		0,17
Ergotamin	Formamid-Wasser 4:6 (v/v) pH: 5,2	0,37
Ergosin		0,55
Ergotaminin		0,16
Ergosinin		0,27
Ergobasin	Formamid-Wasser 1:9 (v/v) pH: 5,0	0,52
Ergobasinin		0,63
Dihydro-ergocornin	Formamid-Wasser 1:4 (v/v) pH: 4,0	0,57
Dihydro-ergokryptin		0,44
Dihydro-ergocristin		0,31

c) Die Ergobasingruppe. Ergobasin und Ergobasinin wandern, wie nach ihrer Löslichkeit in Wasser zu erwarten ist, von allen untersuchten Alkaloiden am weitesten; es genügt deshalb eine wesentlich geringere Formamidkonzentration zu ihrer Chromatographie. Die beiden Isomeren trennen sich gut, wenn als mobile Phase Formamid-Wasser 1 : 9 mit einem pH von 5,0 zur Anwendung kommt. Fig. 3 zeigt das unter diesen Bedingungen erhaltene Chromatogramm; die RF-Werte finden sich in der Tab. 1. Eine Umlagerung während des chromatographischen Prozesses wurde in diesem Falle nicht beobachtet.

d) Das Gemisch der hydrierten Ergotoxinalkaloide. Für die Trennung eines Gemisches von Dihydro-ergocornin, Dihydro-ergokryptin und Dihydro-ergocristin, wie es im „Hydergen“ vorliegt,

¹⁾ Die aufgeführten Werte sind mit einheitlichen Alkaloiden gemessen; im Gemisch sind die entsprechenden Zahlen oft um einen geringen Betrag kleiner, weil sich die so nahe verwandten Alkaloide in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit manchmal etwas beeinflussen.

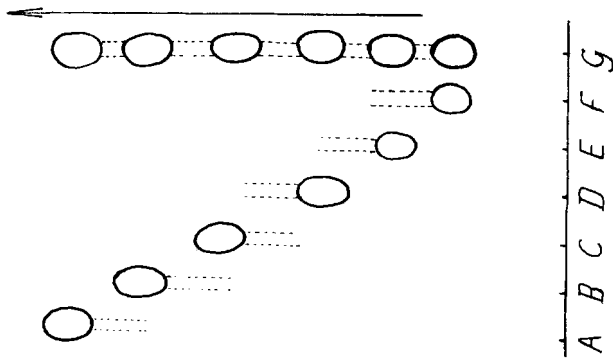


Fig. 1.

A: Ergocornin; B: Ergokryptin;
 C: Ergocristin; D: Ergocorninin;
 E: Ergokryptinin; F: Ergocristinin;
 G: Gemisch aller sechs Substanzen.

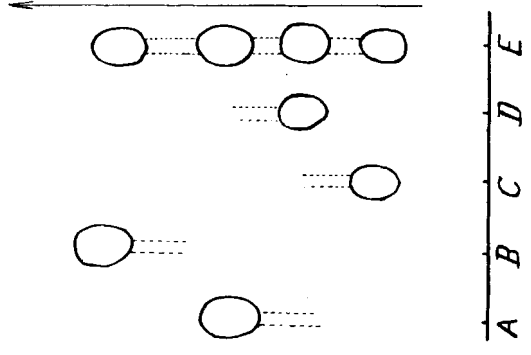


Fig. 2.

A: Ergotamin; B: Ergosin; C: Ergotaminin;
 D: Ergosinin; E: Gemisch aller vier Substanzen.

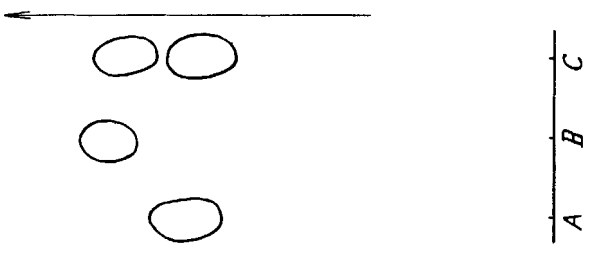


Fig. 3.

A: Ergobasin; B: Ergobasinin;
 C: Gemisch beider Substanzen.

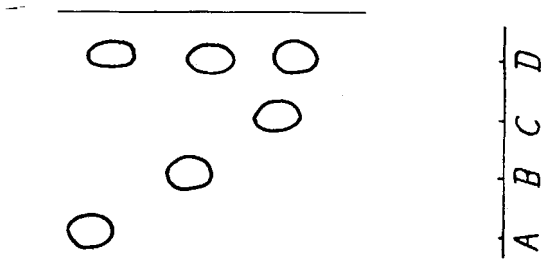


Fig. 4.

A: Dihydro-ergocornin;
 B: Dihydro-ergokryptin;
 C: Dihydro-ergocristin;
 D: Gemisch aller drei Subst.

in seine Komponenten erwies sich eine Lösung von Formamid in Wasser im Volumverhältnis 1 : 4 und ein pH von 4,0 als günstig. Es ergaben sich dabei das in Fig. 4 dargestellte Bild und die in Tab. 1 aufgeführten RF-Werte. Dass hier keine Streifenbildung auftrat, entspricht der Erwartung, denn die Dihydroalkaloide sind zu einer Umlagerung in stereomere Formen nicht fähig¹⁾.

Experimenteller Teil.

Beladung des Chromatographiepapiers mit Phtalsäure-dimethylester. Die Papierstreifen (Whatman Nr. 1) werden mit einem Gemisch aus 10% Phtalsäure-dimethylester und 90% Äther (v/v) getränkt. Als vorteilhaft hat sich der nicht allzu schnell verdunstende Isopropyläther erwiesen. Nach dem Herausnehmen des Papiers aus dem Bade wird die Flüssigkeit durch Drehen gleichmässig verteilt, wobei gleichzeitig ihr Überschuss abtropft. Darauf lässt man den Äther sich verflüchtigen, zunächst unter weiterem Drehen des Papiers, dann durch Hängenlassen an der Luft. Nach 15 Min., während welcher Zeit die zu chromatographierende Substanz bereits aufgetragen wird, muss dieses in die vorbereitete Chromatographiekammer gebracht werden, da bei längerem Aussetzen an der Luft auch merkliche Mengen Phtalsäure-dimethylester verdunsten. Ein so vorbehandelter Bogen weist noch gute Saugfähigkeit für Wasser auf.

Das Auftragen der Substanz. Das Alkaloidpräparat wird in Methanol oder Chloroform oder in einem Gemisch beider gelöst; nur für das am schwersten lösliche Ergotaminin muss als Lösungsmittel Pyridin herangezogen werden. Die Konzentration soll für jede Komponente etwa 1 bis 2% betragen. Diese Lösung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt, um zu vermeiden, dass sich die Alkaloide beim Stehen schon teilweise umlagern. Man bringt davon mit Hilfe einer graduierten Kapillare etwa 1 mm³, worin also ca. 10 bis 20 γ an jedem Einzelalkaloid enthalten sind, auf die Startlinie des Bogens, und zwar etwa 10 Min. nach dessen Herausnahme aus dem Ester-Äther-Bad. Das genannte Lösungsvolumen ist bedeutend kleiner als die üblicherweise in der Papierchromatographie verwendete Lösungsmenge; der Grund hiefür liegt darin, dass die Substanz sich im Phtalsäure-dimethylester noch ausbreitet.

Das Formamid-Wasser-Gemisch. Käufliches Formamid enthält als Verunreinigung in wechselnder Menge Ameisensäure und kann davon nur schwer gereinigt werden. Man verdünnt das unter Verwerfung eines beträchtlichen Vorlaufs und Rückstandes im Vakuum destillierte Formamid zunächst mit etwas weniger als der für das vorgesehene Verhältnis nötigen Menge Wasser. Das potentiometrisch gemessene pH dieses Gemisches beträgt meist 4,2 bis 4,5; es wird durch Zusatz von wenig Ameisensäure bzw. verdünnter Natronlauge auf den gewünschten Stand gebracht, worauf man mit Wasser bis zum verlangten Volumen auffüllt und das Gemisch zwecks Sättigung mit wenig Phtalsäure-dimethylester schüttelt. Der nicht aufgenommene Teil des Esters kann durch einfaches Filtrieren entfernt werden. Die für jede Alkaloidgruppe nötige Formamidkonzentration und das günstige pH sind im Text des Allgemeinen Teils und in der Tab. 1 aufgeführt.

Das Chromatographieren. Wir verwenden dazu die Apparatur nach *Hellmann*²⁾, die vor intensivem Licht geschützt aufgestellt wird, und arbeiten nach der aufsteigenden Methode. Auf dem Boden der Kammer befindet sich eine weite Schale mit der wässrigen Formamidlösung. Nachdem der Bogen in die Kammer gehängt und der Ausgleich beim Stehen über Nacht erfolgt ist, wird der Bogen gesenkt, bis er in die wässrige Flüssigkeit eintaucht. Die zur Trennung der Substanzen nötige Steighöhe der mobilen Phase wird nach ca. 9 Std. erreicht. Den herausgenommenen Bogen trocknet man 45 Min. bei 100°

¹⁾ *A. Stoll & A. Hofmann*, *Helv.* **26**, 2070 (1943).

²⁾ *H. Hellmann*, *Z. physiol. Ch.* **288**, 95 (1951).

Die *Van Urk*-Reaktion mit den Alkaloiden auf dem Papier. Der getrocknete Bogen wird mit einer wegen der geringen Löslichkeit des Reagens erwärmten 0,5-proz. Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Cyclohexan getränkt und durch Verdunstenlassen an der Luft vom Lösungsmittel befreit. Die Alkaloide sind in Cyclohexan vollständig unlöslich. Nun bringt man den locker zusammengerollten Bogen in einen Exsikkator, der in seinem Unterteil konzentrierte Salzsäure enthält. In der Atmosphäre von Chlorwasserstoffgas werden die mit Alkaloid beladenen Stellen nach kurzer Zeit als blauviolette Flecken sichtbar.

Zusammenfassung.

Es wird eine papierchromatographische Methode beschrieben, die innerhalb der natürlichen Gruppen von Mutterkornalkaloiden alle Komponenten, einschliesslich ihrer stereomeren Umlagerungsprodukte, sowie die hydrierten Komponenten des Ergotoxins zu trennen gestattet. Das Prinzip des Verfahrens besteht in der Anwendung von Phtalsäure-dimethylester als stationärer Phase und eines Gemisches von Formamid und Wasser mit einem geringen Gehalt an Ameisensäure als mobiler Flüssigkeit, wobei das Mengenverhältnis von Formamid und Wasser sowie das durch den Ameisensäuregehalt bedingte pH der Mischung für die einzelnen Alkaloidgruppen verschieden sind.

Pharmazeutisch-Chemisches Laboratorium *Sandoz*, Basel.

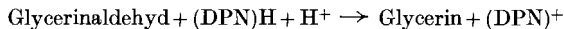
202. Über die Glycerindehydrase der Leber. II¹).

Kurze Mitteilung

von **F. Leuthardt** und **H. P. Wolf**.

(19. VIII. 54.)

Wir haben kürzlich ein Ferment aus Rattenleberextrakten beschrieben, das den Wasserstoff von hydrierter Cozymase auf DL-Glycerinaldehyd überträgt:



Wir haben das Ferment „Glycerindehydrase“ genannt¹). Wir möchten im folgenden einige ergänzende Angaben zu unserer früheren Arbeit mitteilen.

1. Es war uns in unserer ersten Arbeit nie gelungen, die Reaktion umzukehren, also eine Reduktion der Cozymase durch Glycerin bei Anwesenheit des Ferments nachzuweisen. Dies ist aber möglich bei Verwendung eines Semicarbazid-Glykokoll-NaOH-Puffers vom pH 10. Man kann auf diese Weise im optischen Test Cozymase mit Glycerin hydrieren.

¹) 1. Mitteilung, *H. P. Wolf & F. Leuthardt*, *Helv.* **36**, 1463 (1953).