

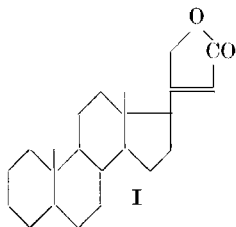
211. Nachweis von Glykosiden und Aglykonen vom Scilla-Bufo-Typ auf Papierchromatogrammen durch direkte Photokopie.

Glykoside und Aglykone, 153. Mitteilung¹⁾

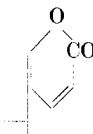
von R. Bernasconi, H. P. Sigg und T. Reichstein.

(7. X. 55.)

Digitaloide Glykoside und Aglykone vom Digitalis-Strophanthus-Typ (I) lassen sich auf Papierchromatogrammen leicht durch Farbreaktionen nachweisen. Hierfür sind Dinitrobenzol (oder Derivate) in alkalischer Lösung, so die *Raymond*-Reaktion²⁾ oder die *Kedde*-Reaktion³⁾ besonders geeignet. Diese Reaktionen sind empfindlich (2–5 γ Substanz werden noch erfasst) und stellen eine Nachweismethode des Butenolidrings dar. Sie sind also soweit spezifisch, dass alle Stoffe, die diesen enthalten, die Färbung geben. Auch eine grosse Anzahl anderer Reaktionen wurde empfohlen⁴⁾; sie sind aber eher für Spezialzwecke geeignet, da sie teilweise von den Substituenten oder vom Zuckeranteil abhängig sind.



Digitalis-Strophanthus-Typ



II

Scilla-Bufo-Typ

¹⁾ 152. Mitteilung: H. P. Sigg, Ch. Tamm & T. Reichstein, *Helv.* **38**, 1721 (1955).

²⁾ Diese Reaktion (m-Dinitrobenzol und NaOH in Alkohol) wurde zuerst von R. Marthoud, Thèse Doct. Univ. (Pharm.) Lyon 1935, angegeben. Vgl. weiter W. D. Raymond, *Analyst* **63**, 478 (1938); **64**, 113 (1939); R. C. Anderson & K. K. Chen, *J. Amer. pharmac. Ass.* **35**, 353 (1946); I. Canbäck, *Svensk Farmac. Tidskr.* **54**, 201 (1950); O. Schindler & T. Reichstein, *Helv.* **34**, 108 (1951).

³⁾ 3,5-Dinitrobenzoesäure und Alkali, D. L. Kedde, Diss. Leyden 1946, vgl. I. E. Bush & D. A. H. Taylor, *Biochem. J.* **52**, 643 (1952); E. Heftmann & A. J. Levant, *J. biol. Chemistry* **194**, 703 (1952).

⁴⁾ Vgl. Zusammenstellungen und neuere Angaben bei P. Bellet, *Ann. pharmac. franç.* **8**, 471 (1950); E. Jaminet, *J. pharmac. Belg.* **5**, 297 (1950); A. B. Svendsen & K. B. Jensen, *Pharmac. Acta Helv.* **25**, 241 (1950); K. B. Jensen, *Acta pharmacol. toxicol. (København)* **9**, 99 (1953); **10**, 69 (1954); M. Pesez, *Ann. pharmac. franç.* **10**, 104 (1952); E. Heftmann & A. J. Levant, *J. biol. Chemistry* **194**, 703 (1952); E. Habermann, W. Müller & A. Schregelmann, *Arzneimittel-Forsch.* **3**, 30 (1953); M. Frèrejacque & M. Durgeat, *C. r. hebdom. Séances Acad. Sci.* **236**, 410 (1953); R. Tschesche & K. Sellhorn, *Chem. Ber.* **86**, 54 (1953); R. Tschesche, G. Grimmer & F. Seehofer, *ibid.* **86**, 1235 (1953); R. Tschesche & F. Seehofer, *ibid.* **87**, 1108 (1954); F. Kaiser, *ibid.* **88**, 556 (1955).

Die Glykoside und Aglykone von Scilla-Bufo-Typ (II) enthalten den Cumalinring. Es ist bisher keine empfindliche Farbreaktion für diesen Ring bekannt. Für den Nachweis von Glykosiden und Aglykonen dieses Typs (II) auf Papierchromatogrammen benutzte Meyer¹⁾ SbCl_3 ²⁾³⁾, Katz⁴⁾⁵⁾ eine Lösung von H_2SO_4 in Furfurol-Eisessig⁴⁾ oder Dimethylamino-benzaldehyd- H_2SO_4 ⁵⁾. Diese und ähnliche Reaktionen sind in vielen Fällen äusserst nützlich und können besonders auch zur Kennzeichnung individueller Stoffe sehr wertvoll sein. Sie sind jedoch weitgehend von den Substituenten abhängig und in keiner Weise für den Cumalinring spezifisch. Daher ist der Farbton, die Intensität bzw. Empfindlichkeit oft sehr verschieden, und keines der Reagentien gibt Sicherheit, dass auf Papierchromatogrammen alle vorhandenen Stoffe des Typs II erfasst werden.

Um auf Papierchromatogrammen alle Stoffe vom Typ II mit Sicherheit und mit gleicher Empfindlichkeit zu erfassen, schien uns die Methode der direkten Photokopie⁶⁾ besonders geeignet. Der Cumalinring zeigt bekanntlich im UV. eine breite Absorptionsbande mit Maximum bei ca. $300 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = \text{ca. } 3,72-3,74$ ⁷⁾. Bei Bestrahlung mit UV.-Licht ungefähr dieser Wellenlänge sollte es daher möglich sein, einen Fleck auf Papier durch direkte Photokopie sichtbar zu machen. Für die praktische Durchführbarkeit der Methode ist es somit in erster Linie erforderlich, eine möglichst einfache Lichtquelle bzw. ein passendes Filter zu finden, welches UV.-Licht mit Schwerpunkt gegen $300 \text{ m}\mu$ oder besser von einem Bereich von $280-320 \text{ m}\mu$ aussendet. Die beste Lösung wäre ein Monochromator, und es soll versucht werden, einen solchen zu bauen. Vorläufig konnten aber auch mit Filtern gute Resultate erreicht werden. Die im folgenden beschriebene Kombination hat sich am besten bewährt, obwohl sie den oben formulierten Bedingungen nicht voll genügt.

Als Lichtquelle wurde ein Quecksilber-Quarz-Hochdruck-Brenner aus der Philips Lampe HP 500⁸⁾ verwendet, dessen Lichtemission nach Angabe der Firma Philips in Eindhoven⁹⁾

¹⁾ K. Meyer, Privatmitteilung.

²⁾ D. Lawday, Nature **170**, 415 (1952).

³⁾ P. Zoller & Ch. Tamm, Helv. **36**, 1744 (1953).

⁴⁾ A. Katz, Helv. **36**, 1344 (1953).

⁵⁾ A. Katz, Pharmac. Acta Helv. **29**, 369 (1954).

⁶⁾ Anwendung bei Purinderivaten vgl. R. Markham & J. D. Smith, Nature **163**, 250 (1949); Biochem. J. **45**, 294 (1949); **49**, 401 (1951); J. P. Goeller & S. Sherry, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **74**, 381 (1950); bei Steroiden mit starker Absorption bei $240 \text{ m}\mu$ vgl. W. J. Haines & N. A. Drake, Fed. Proc. **9**, 180 (1950); S. A. Simpson u. Mitarb., Helv. **37**, 1163 (1954).

⁷⁾ A. Stoll & A. Hofmann, Helv. **18**, 401 (1935); H. Wieland, G. Hesse & R. Hüttel, Liebigs Ann. Chem. **524**, 203 (1936); R. Tschesche & H. A. Offe, Ber. deutsch. chem. Ges. **69**, 2361 (1936); J. Fried & R. C. Elderfield, J. org. Chemistry **6**, 566 (1941).

⁸⁾ Der Brenner wurde von Herrn A. Balzer, Basel, bezogen. Wir danken Herrn Balzer auch hier für seine nützlichen Angaben betr. Charakteristik der Lampen. Nach Angabe von Philips AG., Zürich, ist die alte Bezeichnung „HP 500“ heute nicht mehr gebräuchlich. Diese Lampen sind jetzt unter der Bezeichnung „HP 125 W“ bekannt.

⁹⁾ Wir danken der Firma Philips, Eindhoven, für die Erlaubnis zur Publikation der Fig. 1.

ungefähr die in Fig. 1 wiedergegebene relative spektrale Energieverteilung aufweist¹⁾. Zur Entfernung des kurzwelligen Anteils erwies sich sowohl Pyrexglas wie „Perspex“

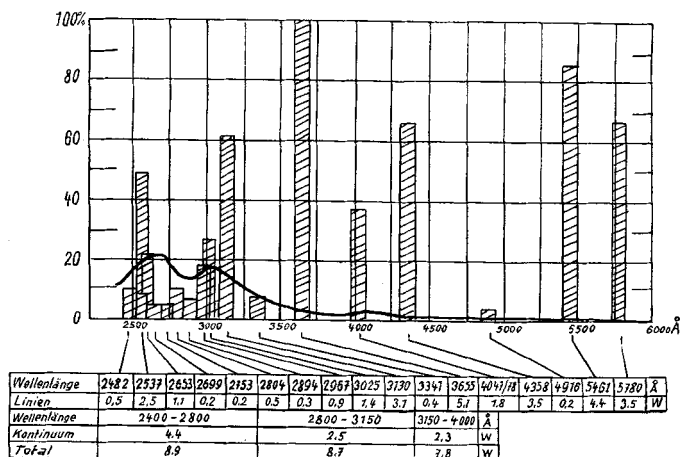


Fig. 1.

Relative spektrale Energieverteilung der Lichtemission des UV.-Brenners HPK 125 W.

geeignet. Diese Materialien zeigten die in Fig. 2 wiedergegebenen UV.-Absorptionsspektren. Trotz den etwas weniger günstigen optischen Eigenschaften wählten wir

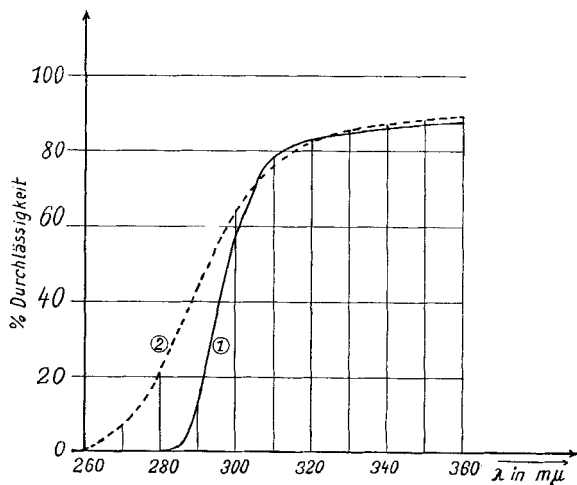


Fig. 2.

Optische Durchlässigkeit²⁾.

Kurve 1: 3 mm Perspex.

Kurve 2: 2 mm Pyrexglas, Corning Glass Works New York, Nr. 9700, poliert.

¹⁾ Vgl. auch die Photometerkurve eines Hg-Brenners spezieller Ausführung bei F. Rössler, Ann. Physik **10**, 187 (1952).

²⁾ Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller in einem „Unicam SP 500“-Spektrophotometer.

„Perspex“⁽¹⁾²⁾, weil es sich leicht bearbeiten (auch bohren) und mit Chloroform kleben lässt, so dass es ein sehr bequemes Material zur Herstellung von Cuvetten darstellt.

Bereits mit dem Perspex-Filter allein war es möglich, brauchbare Resultate zu erhalten. Bei einem Abstand von 1 m (Lichtquelle zu Papier) war eine Belichtungszeit von 1 Sek. geeignet. Fig. 3 zeigt die Photokopie eines Filterpapierstreifens, auf den Substanzproben direkt aufgetropft wurden. 0,01 mg Hellebrigenin (oder irgendein anderes Glykosid oder Genin vom Typus II) gab dabei noch einen deutlich sichtbaren hellen Fleck. Mit 0,1 mg Strophanthidin (Typ. I, aber mit zusätzlicher Aldehydgruppe) war noch kein Fleck sichtbar. Auch die geprüften Lösungsmittel allein (Methanol und Chloroform) gaben keine sichtbaren Flecke, hingegen wurde mit 0,1 mg Cortison (Hauptmaximum bei 238 m μ , aber Vorbande mit $\log \epsilon =$ ca. 2,1 bei 300 m μ) erwartungsgemäss ein schwacher Fleck erhalten.

Für den Nachweis im Papierchromatogramm sind merklich grössere Mengen erforderlich als bei blossem Auftropfen, da die Substanz sich während der Chromatographie auf eine wesentlich grössere Fläche verteilt. In der erwähnten einfachsten Ausführungsform mit Perspexfilter allein sind bei reinen Stoffen jeweils 0,02–0,03 mg nötig, um auch bei langer Laufstrecke noch mit Sicherheit einen deutlichen Fleck zu erhalten. In Fig. 4 ist eine Photokopie eines solchen Papierchromatogramms wiedergegeben³⁾. Es mag noch erwähnt werden, dass sich in der Lösungsmittelfront immer etwas absorbierende Verunreinigungen ansammeln, so dass die Front in der Photokopie fast stets als breites, helles Band sichtbar wird. Nach Herstellung der Photokopie kann der Filterpapierstreifen zweckmässig noch mit geeigneten Farbreagentien besprüht werden. Bei Fig. 4, 9 und 10 wurde SbCl₃ verwendet. Die Farbflecken entstanden genau an den Stellen, die den hellen Flecken der Photokopie entsprechen. Die Färbungen sind jeweils rechts neben der Fig. vermerkt.

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit musste vor allem der langwellige Teil des von der Lampe emittierten Lichtes noch entfernt werden.

Dies wurde weitgehend erreicht durch eine 2 cm dicke Schicht einer wässrigen Lösung von CoSO₄ und NiSO₄⁴⁾. Diese zeigte für sich die in Kurve 2, Fig. 5, wieder-

¹⁾ Es handelt sich um ein klar durchsichtiges Plexiglas auf Basis von Methacrylsäure-methylester (Herstellerfirma *Imperial Chemical Industries Ltd.*), das in Platten verschiedener Dicke im Handel käuflich ist. Wir bezogen es von der Firma *L. Wachendorf & Cie., Schweiz. Gummi- und Asbestgesellschaft, Basel*.

²⁾ Wir möchten auch hier Herrn Dr. *E. A. Johnson* vom *Medical Research Council, Spectrographic Research Unit, London Hospital*, für seine wertvollen Ratschläge bezüglich Verwendbarkeit von Perspex sowie von Kobalt- und Nickelsalzen, bestens danken. (Brief an Dr. *Ch. Tamm* vom 4. 1. 54.)

³⁾ Diese Methode ist bei der Prüfung von Krötengiften bereits benützt worden, vgl. *H. R. Urscheler, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv.* **38**, 883 (1955).

⁴⁾ Vgl. *J. Chanu, E. Guillemot, Mlle J. Lenoble & G. Tendron, C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **233**, 35 (1951).

gegebene Absorption. Nach Zusatz von 10 mm Perspex wurde Kurve 3 erhalten. In dieser störte noch das bei ca. $580\text{ m}\mu$ durchgehende Licht. Dieses wurde durch ein „Rotpurpur-Filter“ Nr. 9863 der *Corning Glass Works*, New York, entfernt. Dieses Filter zeigte allein die in Kurve Nr. 1, Fig. 5 wiedergegebene Durchlässigkeit. Die Kombination beider Filter (CG 9863 sowie Perspex-Cuvette mit Co–Ni-Lösung) gab die in Fig. 6 abgebildete Durchlässigkeit.

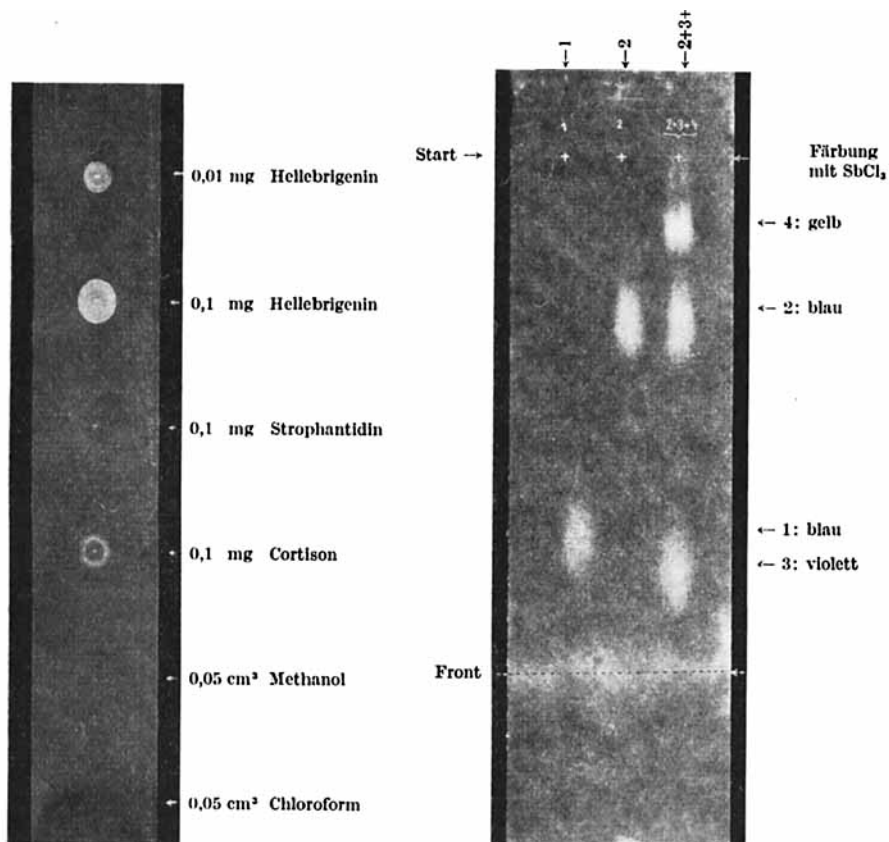


Fig. 3.

Substanzproben
direkt aufgetropft
Filter: nur Perspex

Fig. 4.

Papierchromatogramm¹⁾
R. Ph. = Prgl-W-(4:1)
Bew. Ph. = Be-Chf-(1:1)
Laufzeit: 2½ Std. (t = 20°)
1 = 0,03 mg Bufotalin
2 = 0,03 „ Telocinobufagin
3 = 0,03 „ Marinobufagin
4 = 0,03 „ Hellebrigenin

¹⁾ Hier und im Folgenden gelten die folgenden Abkürzungen: R.Ph. = Ruhende Phase, Bew.Ph. = Bewegliche Phase, Be = Benzol, Chf = Chloroform, Prgl = Propylen-glykol, W = Wasser. Ausführung solcher Chromatogramme nach *E. Schenker, A. Hunger & T. Reichstein*, *Helv.* **37**, 680 (1954).

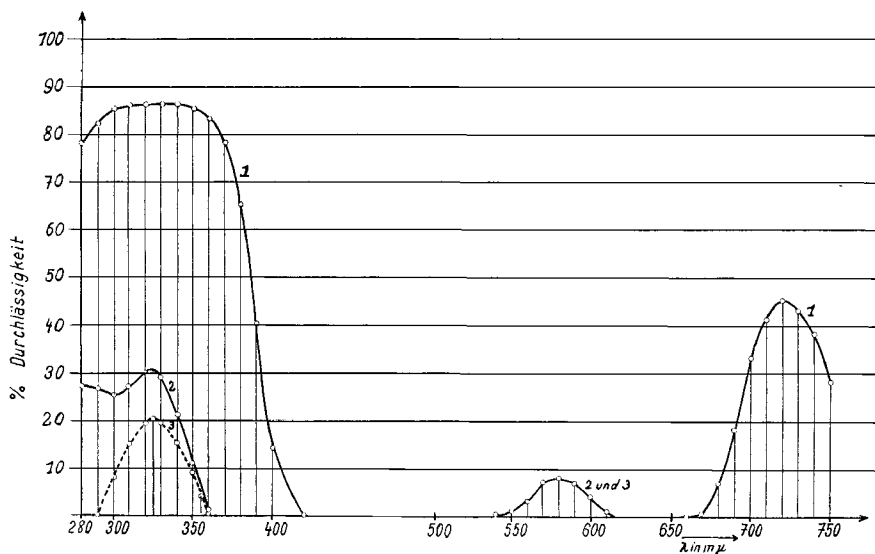


Fig. 5.

Durchlässigkeit im UV.¹⁾

Kurve 1: Corning Glass Works Filter „Read-purple“ Nr. 9863, Dicke 3 mm poliert.

Kurve 2: Filterlösung: 300 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 500 g $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 2 l Wasser.
Schichtdicke 20 mm.

Kurve 3: Filterlösung wie bei 2 und dazu noch 10 mm Perspex.

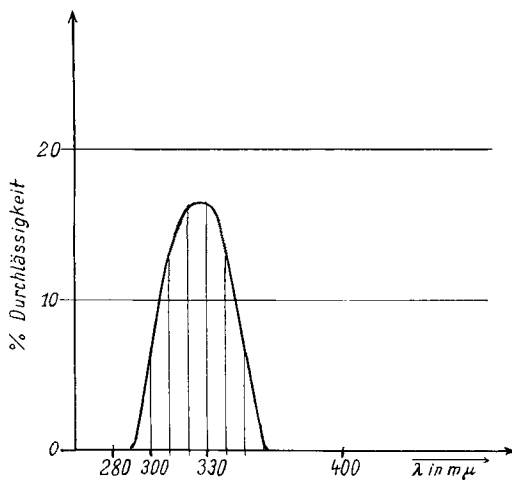


Fig. 6.

Durchlässigkeit der verwendeten Filterkombination.

¹⁾ Aufgenommen von Herrn Dr. P. Zoller im „Unicam SP 500“-Spektrophotometer.

Die Form der Kurve ist sehr günstig, leider liegt der Schwerpunkt der Durchlässigkeit bei ca. 326 m μ statt bei 300 m μ . Trotzdem gab diese Kombination sehr gut brauchbare Resultate. Es wurde die in Fig. 7 schematisch wiedergegebene Anordnung verwendet¹⁾.

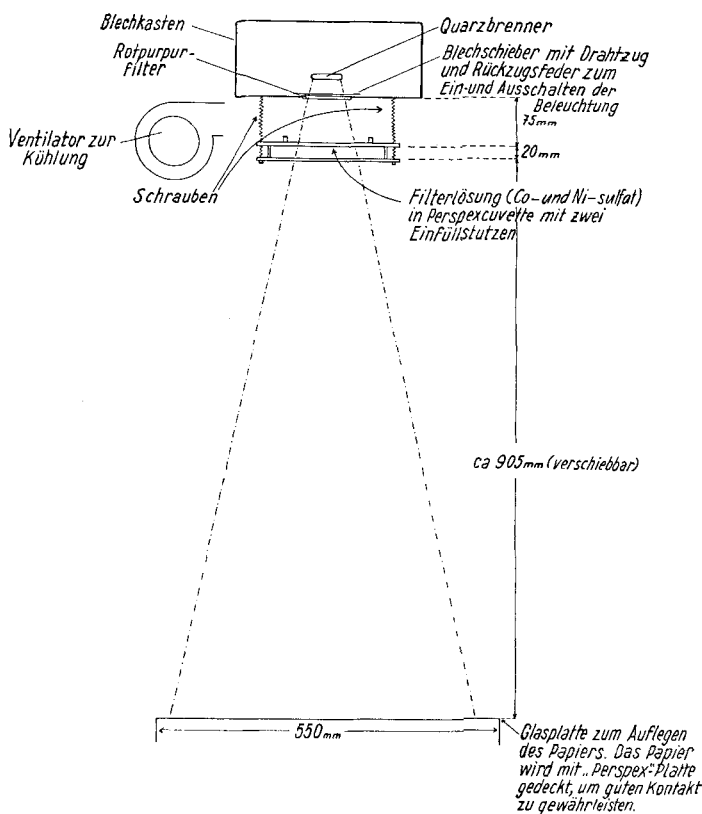


Fig. 7.

Schema der Lampe und Filter für die Photokopierung der Flecke.

Die Lampe befand sich in lichtdichtem Blechkasten und war auf Schienen gegen den Tisch verschiebbar. Normalerweise wurde sie in 1 m Abstand gehalten. Die Austrittsöffnung war mit einem Blechschieber mit Drahtzug sowie Rückzugsfeder versehen, um die Belichtungszeit genau abstoppen zu können. Da Perspex gegen Temperaturen von über 80° empfindlich ist, wurde zur Kühlung zwischen Rotpurpurfilter und Perspex-Cuvette mit einem Ventilator Luft durchgeblasen. Die Cuvette bestand aus zwei 5 mm dicken Perspexscheiben mit Seitenwänden aus demselben Material (wie aus Fig. 7 ersichtlich, zusammengeschraubt und an den Berührungsstellen mit Chloroform verklebt). An den zwei oberen Ecken wurden zwei Einfüllstutzen angebracht und mit Zapfen verschlossen.

¹⁾ Konstruktion E. Lüscher in unserem Institut.

Mit dieser Anordnung wurden bei direktem Auftropfen auf Papier (vgl. Fig. 8) bereits mit 0,001 mg sehr deutliche Flecke erhalten, und im Papierchromatogramm (vgl. Fig. 9 und 10) genügte 2–5 γ für diesen Zweck. Es ist wahrscheinlich, dass mit einem Monochromator die Empfindlichkeit noch etwas gesteigert werden kann, doch ist die Methode für sehr viele Zwecke auch in der beschriebenen Ausführungsform sehr geeignet. Es mag noch erwähnt werden, dass Beispiele der Photokopie mit Filterkombination Rotpurpurglas, Perspex und Lösung von Co-Ni-Sulfat.

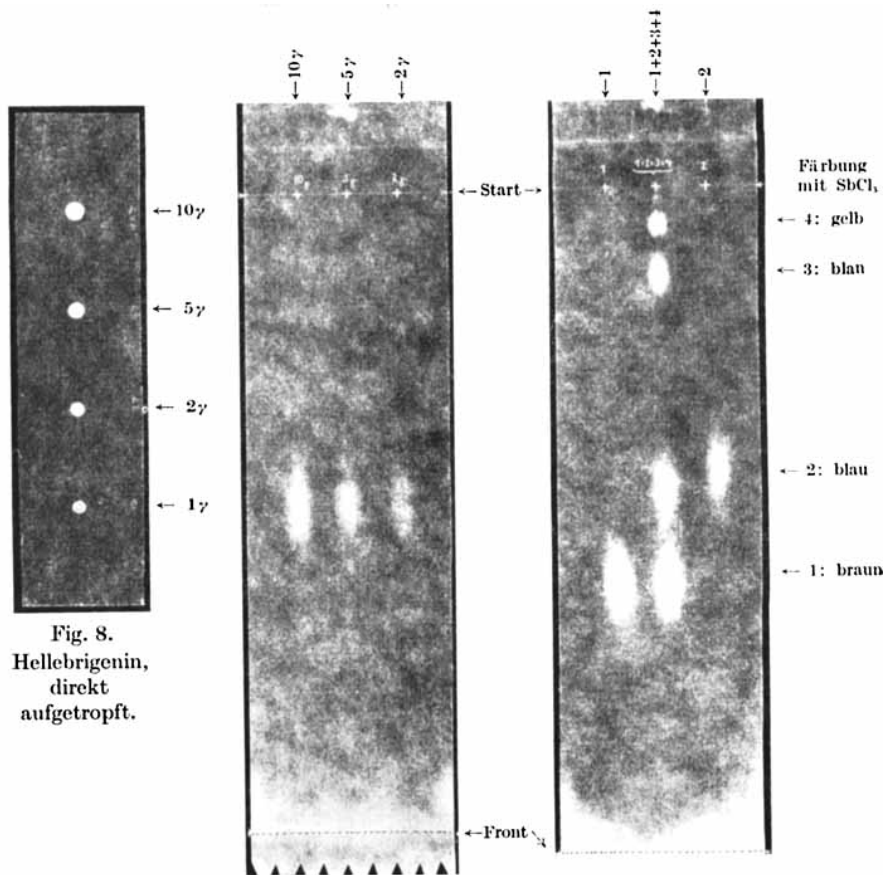


Fig. 8.
Hellebrigenin,
direkt
aufgetropft.

Fig. 9.
Papierchromatogramm
von Bufotalin,
3 $\frac{1}{4}$ Std. 21°.

Fig. 10.
Papierchromatogramm,
4 $\frac{1}{2}$ Std. 21°.
1 = 0,005 mg Marinobufagin;
2 = 0,005 „ Bufotalin;
3 = 0,005 „ Telocinobufagin;
4 = 0,005 „ Hellebrigenin.

Für Fig. 9 und 10 diente folgendes System¹⁾:
R. Ph. = Prgl-W-(4:1); Bew. Ph. = Be-Chf-(1:1).

¹⁾ Bufotalin und Bufalin werden in diesem System nicht getrennt.

in der Dunkelkammer bei Ausschaltung der Perspex-Cuvette mit Filterlösung, also mit dem Rotpurpur-Filter allein, auf den Papierchromatogrammen die Bufogenine ebenfalls in Mengen von 2–5 γ bisher stets als dunkle Flecke auf leicht fluoreszierendem Grund deutlich sichtbar waren. Die Front fluoreszierte hell. Diese Lokalisierung kann für viele Zwecke genügen, ist aber sicher nicht so zuverlässig wie die genannte Photokopie.

Experimenteller Teil.

Lösungsmittel für Papierchromatographie. Propylenglykol: Käuflches Präparat wurde bei 12 Torr destilliert.

Benzol: Thiophenfreies Benzol wurde über Na destilliert.

Chloroform: Käuflches reines Chloroform wurde 48 Std. über K_2CO_3 aufbewahrt und anschliessend destilliert.

Aceton: Reines käuflches Aceton wurde so lange mit $KMnO_4$ versetzt und unter Rückfluss erhitzt, bis die violette Farbe bestehen blieb. Dann wurde abdestilliert, über K_2CO_3 getrocknet und nochmals destilliert.

Vorbehandlung des Papiers¹⁾. Filterpapier (*Whatman* Nr. 1) wurde in Faserichtung in Bahnen von 45×12 cm geschnitten. 7,5 cm vom oberen Ende wurde die Startlinie und darauf die numerierten Startpunkte mit Bleistift aufgetragen. Um eine möglichst horizontale Front zu erhalten, erwies es sich als zweckmässig, das untere Ende zackenförmig auszuschneiden²⁾. Das Papier wurde zweimal durch eine Lösung von 16 cm³ Propylenglykol, 4 cm³ Wasser und 80 cm³ Aceton gezogen, 10 Min. in der Laufrichtung (Startlinie unten) abtropfen gelassen und anschliessend zwischen 3 Lagen frischem Filterpapier abgepresst.

Chromatographie. 0,003–0,03 mg Substanz in 0,02 cm³ Methanol wurden auf den Startpunkt aufgetragen; das Papier wurde 16 Std. in die mit Propylenglykol-Wasser gesättigte Kammer gehängt und anschliessend absteigend chromatographiert. Die bewegliche Phase wurde jeweils mit der ruhenden gesättigt.

Entwicklung des Chromatogramms. Die Streifen wurden 30 Min. bei 90° getrocknet, anschliessend evtl. im gefilterten UV.-Licht (Dunkelkammer) mit Rotpurpur-Glas allein betrachtet und dann unter Verwendung der Kombination beider Filter photokopiert. Um guten Kontakt zu erzielen, geschah dies auf glatter Glasplatte unter Abdeckung mit 3 mm dicker Perspexplatte. Als Photokopierpapier verwendeten wir: Photodokumentenpapier AN der *Kopit AG*, Bern. Die besten Kontraste gab eine Belichtungszeit von 35 Sek., wobei die Lampe mindestens 2 Min. vor der Aufnahme einzuschalten war. Als kontrastreichen Entwickler benützten wir „Agfa 130“, als Fixierbad 300 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ in 1 l Wasser.

Die Entwicklung mit $SbCl_3$ geschah nach *Lawday*³⁾.

Zusammenfassung.

Es wird eine einfache und wirksame Anordnung zum Nachweis von Glykosiden und Aglykonen des *Scilla*-*Bufo*-Typs in Papierchromatogrammen durch direkte Photokopie beschrieben. Es wurden dabei Mengen von 0,005 mg eindeutig erfasst.

Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel.

¹⁾ Vgl. *E. Schenker, A. Hunger & T. Reichstein, Helv.* **37**, 680 (1954).

²⁾ *S. M. Partridge, Nature* **164**, 443 (1949).

³⁾ *D. Lawday, Nature* **170**, 415 (1952).