

## SUMMARY.

The kinetics of complex formation reactions have been studied with Tetraphenylporphine. In the presence of  $Mg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  first the unstable  $Mg^{2+}$  complex is formed and afterwards an exchange reaction, yielding the more stable  $Cu^{2+}$  complex, takes place.

The possible meaning of stability and rate of formation in biochemistry is discussed.

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel.

## 179. Papierchromatographische Trennung der natürlichen 2-Desoxyhexamethylosen und deren 3-Methyläther.

Desoxyzucker, 32. Mitteilung<sup>1)</sup>

von O. Renkonen und O. Schindler.

(7. VII. 56.)

Für die papierchromatographische Unterscheidung der 2-Desoxyhexamethylosen und deren 3-Methyläther, insbesondere für die in digitaloiden Glykosiden vorkommenden Vertreter dieser Gruppe, wurden in der Literatur die folgenden Lösungsmittelsysteme beschrieben<sup>2)</sup>.

Hirst & Jones<sup>3)</sup> haben L-Oleandrose und D-Cymarose im System n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4) verglichen, wobei sich die Rf-Werte nur um ca. 1% unterschieden. Tschesche & Grimmer<sup>4)</sup> konnten im System n-Butanol-Pyridin-Wasser (3:1:3) D-Diginose (Rf: 0,69) einerseits von D-Digitoxose (Rf: 0,60) und D-Boivinose (Rf: 0,61) und andererseits von den drei übrigen, annähernd mit gleichen Rf-Werten (0,75—0,76) wandernden 2-Desoxyhexamethylose-3-methyläthern (D-Sarmentose, D-Cymarose und L-Oleandrose) unterscheiden. Im System Essigester-Pyridin-Wasser (2:1:2) wurden von ihnen<sup>4)</sup> folgende Rf-Werte gemessen: D-Boivinose 0,625, D-Digitoxose 0,665, D-Diginose 0,685, D-Sarmentose 0,74, D-Cymarose 0,755 und L-Oleandrose 0,78. Die gleiche Abtrennung der langsamer wandernden D-Diginose von den drei übrigen Methyläthern wurde auch in dem erstmals von Chargaff und Mitarbeitern<sup>5)</sup> beschriebenen n-Butanol-Pyridin-Wasser-(3:2:1,5)-System erreicht<sup>6)</sup>. Kaiser<sup>7)</sup> hat acht Systeme beschrieben, von denen zwei (n-Butanol-Wasser und n-Butanol-tert. Butanol-Wasser 1:1:1) auch die Unterscheidung von L-Oleandrose und D-Cymarose erlauben sollen. Ebenso soll das System n-Butanol-Wasser zur Trennung von D-Diginose einerseits von den obengenannten zwei Zuckern sowie andererseits auch von D-Digitoxose geeignet sein<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> 31. Mitteilung: H. Muhr & T. Reichstein, Helv. **38**, 499 (1955).

<sup>2)</sup> G. N. Kowkabany, Advances in Carbohydrate Chemistry **9**, 303 (1954).

<sup>3)</sup> E. L. Hirst & J. K. N. Jones, Disc. Faraday Soc. **7**, 268 (1949).

<sup>4)</sup> R. Tschesche & G. Grimmer, Chem. Ber. **87**, 418 (1954).

<sup>5)</sup> E. Chargaff, C. Levine & C. Green, J. biol. Chemistry **175**, 67 (1948).

<sup>6)</sup> J. v. Eeuw, H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **37**, 1493 (1954).

<sup>7)</sup> F. Kaiser, Chem. Ber. **88**, 556 (1955).

<sup>8)</sup> Bei der Wiederholung seiner Versuche im System n-Butanol-Wasser konnten wir zwar D-Digitoxose (Rf: 0,40) und D-Boivinose (Rf: 0,40) von D-Diginose (Rf: 0,52), und diese von den übrigen natürlichen 2-Desoxyhexamethylose-3-methyläthern (Rf: 0,63 bis 0,66) trennen. Zwischen den Laufstrecken von L-Oleandrose und D-Cymarose konnten wir jedoch Unterschiede von höchstens 1—2% beobachten, wobei D-Cymarose wahrscheinlich etwas rascher lief als L-Oleandrose. Möglicherweise sind diese unterschiedlichen Resultate auf Verschiedenheiten im angewendeten Papier zurückzuführen.

In allen bisher beschriebenen Systemen sind die Rf-Werte der besprochenen Zucker grösser als 0,60. *Jermyn & Isherwood*<sup>9)</sup> haben aber beobachtet, dass die papierchromatographische Trennung der von ihnen untersuchten Zucker in Systemen mit kleinen Rf-Werten und entsprechend längeren Laufzeiten besser gelingt als in Systemen mit grossen Rf-Werten. Aus diesem Grund haben wir versucht, Systeme zu finden, in denen die erwähnten Zucker mit kleineren Rf-Werten wandern. Die folgenden Lösungsmittelsysteme erfüllen diese Bedingung und erlauben tatsächlich eine Trennung und sichere Unterscheidung der untersuchten 2-Desoxyhexamethylösen und deren 3-Methyläther.

System I: Toluol-n-Butanol (1:9) : Wasser

System II: Toluol-n-Butanol (4:1) : Wasser

System III: Toluol-Methyläthylketon (1:1) : Wasser

Die Rf-Werte der untersuchten Zucker in diesen drei Systemen sind in der Tab. 1 zusammengestellt.

**Tabelle 1.**

Zucker	Rf-Werte		
	System I	System II	System III
D-Boivinose . . .	0,39	0,01	0,006
D-Digitoxose . . .	0,39	0,01	0,01
D-Diginose . . . .	0,53	0,06	0,04
D-Sarmentose . . .	0,665	0,10	0,05
D-Cymarose . . .	0,625	0,10	0,08
L-Oleandrose . . .	0,625	0,06	0,06

In den Systemen II und III sind die Rf-Werte sehr von der Methode des notwendigen Imprägnierens mit der stationären Phase abhängig und sind deshalb als absolute Werte für die Identifizierung ungeeignet. Ausserdem sind sie in diesen Systemen so klein, dass man, um eine sichtbare Trennung zu erreichen, die Lösungsmittelfront über das Papierende laufen lassen muss. Die so erhaltenen Resultate sind in der Tab. 2, wie üblich, in Form von Verhältniszahlen der Laufstrecken (D-Cymarose = 1) dargestellt. Diese Verhältniszahlen sind viel weniger als die Rf-Werte von der Imprägnierungsmethode abhängig und sind mindestens bei konstanter Laufstrecke der Vergleichssubstanz reproduzierbar.

Es geht aus der Tab. 2 hervor, dass im System III alle untersuchten Zucker ausser D-Sarmentose und L-Oleandrose eindeutig voneinander trennbar sind. Die letzteren lassen sich aber im System II gut trennen. Die Kombination der Systeme II und III erlaubt somit eine sichere Unterscheidung der untersuchten Zuk-

<sup>9)</sup> *M. A. Jermyn & F. A. Isherwood, Biochem. J.* **44**, 402 (1949).

ker<sup>10</sup>). Dabei bildet die Umkehr der Reihenfolge zwischen D-Sarmentose, D-Cymarose und L-Oleandrose in den Systemen II und III eine zusätzliche Sicherheit in der Zuordnung der Flecken. Der Unterschied in der Reihenfolge dieser drei Zucker in den untersuchten Lösungsmittelsystemen bildet eine Ausnahme zu Gesetzmäßigkeiten, die *Isherwood* und *Jermyn*<sup>11</sup>) beobachtet haben.

Tabelle 2.

Verhältniszahlen der Laufstrecken, bezogen auf die Laufstrecke von D-Cymarose

Zucker	R <sub>Cymarose</sub> -Werte		
	System I	System II	System III
D-Boivinose . . .	0,62 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,02
D-Digitoxose . . .	0,62 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02
D-Diginose . . . .	0,85 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,45 ± 0,04
D-Sarmentose . . .	1,04 ± 0,02	1,06 ± 0,03	0,69 ± 0,04
L-Oleandrose . . .	0,99 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,75 ± 0,04
D-Cymarose . . .	1,00	1,00	1,00

Wir danken Herrn Prof. T. Reichstein für die Anregung zu dieser Arbeit.

Der eine von uns (O. R.) dankt dem *Suomen Kulttuurirahasto-Fonds* (Helsinki) für ein Stipendium, das ihm die Ausführung dieser Arbeit ermöglichte.

### Experimenteller Teil.

Reinigung der benutzten Lösungsmittel: *n*-Butanol wurde 16 Std. mit CaO gekocht, abgekühlt, filtriert und destilliert, wobei je ca. 5% Vor- und Nachlauf abgetrennt wurden.

*Methyläthylketon* wurde 16 Std. mit geglühter Pottasche auf der Maschine geschüttelt, abfiltriert und wie oben destilliert; Sdp.<sub>760</sub>: 78—78,5°.

*Toluol* wurde mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4mal während je ca. 5—10 Min. gut durchgeschüttelt, mit Wasser und 50% KOH gewaschen und über festem KOH wie oben destilliert.

*Aceton* wurde über KMnO<sub>4</sub> langsam destilliert, 16 Std. über geglühter Pottasche getrocknet, abgegossen und destilliert.

*Wasser*: Es wurde das in einer Kupfer-Blase destillierte Wasser verwendet.

Präparieren der als mobile Phase dienenden Lösungsmittelgemische: System I: Es wurden Toluol, *n*-Butanol und Wasser im Verhältnis 1:9:2<sup>12</sup>) gut durchgeschüttelt und im Chromatographieraum über Nacht trenngelassen. Die obere, leichtere Schicht wurde als mobile Phase verwendet.

System II: Es wurden Toluol, *n*-Butanol und Wasser im Verhältnis 8:2:1 wie oben geschüttelt und trenngelassen. Die obere Schicht diente als mobile Phase.

System III: Es wurden Toluol, Methyläthylketon und Wasser im Verhältnis 12:12:1 geschüttelt, wie oben trenngelassen, und wieder die obere Schicht gebraucht.

<sup>10</sup>) Herr Dr. S. E. Wright hat neben den hier geprüften Zuckern auch 2-Desoxy-L-rhamnose und 2-Desoxy-L-fucose im System II untersucht. Er erhielt dabei die folgenden Resultate, für deren Überlassung wir auch hier bestens danken: 2-Desoxy-L-rhamnose: R<sub>Boivinose</sub>: 1,20; 2-Desoxy-L-fucose: R<sub>Boivinose</sub>: 0,85. Wenn man diese Werte in die hier benutzten R<sub>Cym.</sub>-Werte mit Hilfe des Faktors (0,11) aus Tabelle 2 umrechnet, so ergeben sich die folgenden Zahlen: 2-Desoxy-L-rhamnose: R<sub>Cym.</sub>: 0,13; 2-Desoxy-L-fucose: R<sub>Cym.</sub>: 0,09.

<sup>11</sup>) F. A. Isherwood & M. A. Jermyn, *Biochem. J.* **48**, 515 (1951).

<sup>12</sup>) Die Verhältniszahlen beziehen sich immer auf Volumenteile.

Auf den Boden der Chromatographie-Tröge wurde zur Sättigung der Atmosphäre etwas von der mobilen Phase und Wasser gegeben und mittels Filterpapierstreifen an die Wände des Troges aufgezogen. Erst nach einer Sättigungszeit von wenigstens 24 Std. wurde der Trog als fertig für die Chromatographie betrachtet.

Vorbehandlung der gebrauchten *Whatman* Nr. 1-Papiere. Für das System I wurden die Substanzen auf das nicht vorbehandelte, käufliche *Whatman* Nr. 1-Papier aufgetragen, das Papier in den Trog gehängt und unmittelbar chromatographiert.

Für die Systeme II und III wurde die folgende Methode des Imprägnierens gewählt, wobei das genaue Einhalten der angegebenen Bedingungen für reproduzierbare Resultate von Bedeutung ist: Das trockene Papier wurde durch eine Lösung von 1 Teil Wasser in 2 Teilen Aceton im Laufe von 3–5 Sek. durchgezogen und während 5–6 Min. mit Startlinie nach unten hängend das Aceton bei 22° verdunsten gelassen. Nach Auftragen der betreffenden Substanzen wurde das Papier so lange bei 22° liegengelassen, bis der untere Teil des Bogens sich trocken anfühlte. Dies war nach ca. 10 Min. der Fall; der obere Teil des Papiers (mit der Startlinie) war dann noch schwach feucht. Dann wurde das Papier in den Trog gehängt und unmittelbar chromatographiert.

Das Auftragen der Substanzen: Es wurden pro Startfleck je 0,05–0,1 mg von reinem Zucker in 1-proz. Lösung in Aceton auf die Papiere pipettiert.

Die untersuchten krist. Zucker-Präparate waren:

D-Digitoxose: Smp. 105–113° (aus Aceton-Äther), durch saure Hydrolyse eines rohen Digitoxin-Präparates<sup>13)</sup><sup>14)</sup> erhalten.

D-Boivinose: Smp. 92–97° (aus Aceton-Äther), aus Strobosid<sup>15)</sup>.

D-Diginose: Smp. 72–80° (aus Äther-Pentan), aus Ambosid<sup>16)</sup>.

D-Sarmentose: Smp. 57–67° (aus Äther-Pentan), aus Sarmentocymarin<sup>17)</sup>.

D-Cymarose: Smp. 74–89° (aus Äther-Pentan), aus Cymarin<sup>18)</sup>.

L-Oleandrose: Smp. 55–63° (aus Äther-Pentan), synthetisch<sup>19)</sup>.

Die Chromatographie erfolgte absteigend bei 21° ± 1°. Die Laufzeiten für das System I betragen ca. 15 Std., wobei die Lösungsmittelfront ca. 30 cm wanderte. Die in der Tab. 2 aufgeführten Verhältniszahlen für das System II wurden mit Laufzeiten von 16 Std. gemessen, wobei D-Cymarose einen Weg von ca. 14 cm zurückgelegt hatte. Die entsprechenden Zahlen für das System III wurden ebenfalls mit Laufzeiten von 16–17 Std. gemessen. Die Laufstrecke von D-Cymarose betrug dabei durchschnittlich 17 cm.

Entwicklung der Chromatogramme: Für den Nachweis der Zucker wurden die Papiere während ca. 5 Min. in einem starken Luftstrom bei 22° getrocknet, mit saurem Anilinphthalat in n-Butanol<sup>20)</sup> besprüht und ca. 1–3 cm über einer heissen elektrischen Kochplatte gehalten, bis die gelbbraunen Flecken sichtbar wurden. Die Papiere wurden dann zusätzlich noch unter einer UV.-Lampe geprüft, wobei die Flecken besser sichtbar wurden als im gewöhnlichen Licht. — Der ungefähre Mittelpunkt der Flecken diente für die Messung der Laufstrecke.

### Zusammenfassung.

Die papierchromatographische Trennung und sichere Unterscheidung der natürlichen 2-Desoxyhexamethylösen und deren 3-Methyläther durch Benützung von 2 verschiedenen Lösungsmittelsystemen wird beschrieben.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

<sup>13)</sup> *H. Kiliansi*, Arch. Pharmaz. **233**, 311 (1895); **234**, 481 (1896).

<sup>14)</sup> Wir danken der *CIBA Aktiengesellschaft* bestens für die Überlassung von Mutterlagen der Digitoxin-Fabrikation.

<sup>15)</sup> *O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **35**, 730 (1952).

<sup>16)</sup> *H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein*, Helv. **37**, 2204 (1954).

<sup>17)</sup> *W. A. Jacobs & M. J. Heidelberger*, J. biol. Chemistry **81**, 765 (1929).

<sup>18)</sup> *A. Windaus & L. Hermanns*, Ber. deutsch. chem. Ges. **48**, 979 (1915).

<sup>19)</sup> *F. Blindenbacher & T. Reichstein*, Helv. **31**, 2061 (1948).

<sup>20)</sup> *S. M. Partridge*, Nature **164**, 443 (1949).