

Zusammenfassung.

Hellebrigenin wurde durch Dehydrierung mit O_2 und Pt und anschliessendes Verkochen mit Essigsäure in 3-Dehydro-scilliglaucosidin übergeführt. Letzteres wurde mit $NaBH_4$ zu 3-Epi-scilliglaucosidin-19-ol und Scilliglaucosidin-19-ol reduziert. Da sich letzteres, wenn auch in schlechter Ausbeute, mit tert. Butylchromat zu Scilliglaucosidin dehydrieren lässt, sind auf diesem Weg Hellebrigenin und Scilliglaucosidin direkt miteinander verknüpft worden.

Dehydrierung von 3-Epi-scilliglaucosidin-19-ol und Scilliglaucosidin-19-ol mit O_2 und Pt führt zu 3-Dehydro-scilliglaucosidin-19-ol; gleichzeitig entsteht auch etwas 3-Dehydro-scilliglaucosidin. 3-Dehydro-scilliglaucosidin-19-ol wurde auch durch katalytische Dehydrierung von Hellebrigenol und anschliessendem Verkochen des Dehydrierungsproduktes mit Essigsäure gewonnen; auch hier wird etwas 3-Dehydro-scilliglaucosidin gebildet.

Analoge Behandlung von Strophanthin führte zu 3,19-Dioxo-14-hydroxy-cardodien-(4; 20:22)-olid, welches mit $NaBH_4$ zu dem 3 α - und dem 3 β ,14,19-Trihydroxy-cardodien-(4;20:22)-olid reduziert wurde.

Organisch chemische Anstalt der Universität Basel.

98. Zur kombinierten Anwendung der Papierionophorese und Papierchromatographie

von C. G. Honegger.

(14. III. 57.)

1. Einleitung. Zweifellos ist die zweidimensionale ionophoretisch-chromatographische Auftrennung eine Methode, die über die Zusammensetzung eines salzförmigen Substanzgemisches die sichersten Aussagen zu liefern vermag. Sind doch aus den ionophoretischen Wanderungswerten der Ladungszustand einer Substanz und aus den chromatographischen Wanderungswerten die Löslichkeitsverhältnisse im verwendeten Chromatographiemisch ohne weiteres ersichtlich, welche zusammen mit der Anfärbbarkeit wichtige Schlüsse in bezug auf die Konstitution der zu untersuchenden Substanzen zulassen.

In einer früheren Mitteilung¹⁾ wurde eine neue Variante zur kombinierten, zweidimensionalen ionophoretisch-chromatographischen Auftrennung beschrieben, in welcher die zwei Trennoperationen auf

¹⁾ C. G. Honegger, Helv. **39**, 1671 (1956).

zwei Papieren ausgeführt und die Übertragung der Substanzen vom Ionophorese- auf das Chromatographiepapier durch Elution erreicht wurde. Diese Methode hat sich z. B. bei der Auftrennung flüchtiger Basen bisher bestens bewährt. In der vorliegenden Arbeit soll einerseits eine einfachere Elutionsvorrichtung und andererseits für schwer eluierbare Substanzen eine neue Anordnung der kombinierten ionophoretisch-chromatographischen Auftrennung auf einem Papier und ihre Anwendung auf den Extrakt aus einem Tumorgewebe beschrieben werden.

Der Vollständigkeit halber soll hier ausserdem noch erwähnt werden, dass die „umgekehrte“ „strip transfer“-Methode, in welcher ein ausgeschnittener Ionophoresestreifen, der an das Chromatographiepapier angepresst wird, der unregelmässigen Ablösung der Substanzen wegen für die zweidimensionale Auftrennung ungeeignet ist²⁾.

2. Modifizierte Elutionsvorrichtung. In der verbesserten und vereinfachten Elutionsvorrichtung wurden die in der früheren Mitteilung¹⁾ beschriebenen zwei Plexiglasplatten A und C, die Glasplatte B und der Trog für das Elutionsmittel auf nur zwei speziell konstruierte Glasplatten A und B reduziert (vgl. Fig. 1–8).



Fig. 1.

Platte A Seitenansicht



Fig. 2.

Platte A Querschnitt

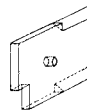


Fig. 3.

Platte A Schrägansicht



Fig. 4.

Platte B Seitenansicht



Fig. 5.

Platte A und B Querschnitt

Für die zwei neuen Platten wurde Spiegelglas an Stelle von Plexiglas verwendet, um bei der Wahl des Elutionsmittels unabhängig zu sein. Diese zwei Glasplatten A und B wurden so konstruiert (Fig. 1–5), dass oben und unten an den Platten bis 4,5 cm zum seitlichen Rand eine (schräffierte) Aussparung ($40 \times 0,5 \times 0,5$ cm) entstand, welche beim Zusammenlegen der Platten oben eine Wanne und unten eine Kante bildet³⁾. Die zwei Glasplatten ($49 \times 4,5 \times 0,6$ cm) können an jedem Ende mittels einer Schraube zusammengepresst werden, welche durch eine runde Öffnung der hinteren Platte A (Fig. 1–3) und durch einen Schlitz der vorderen Platte B (Fig. 4) hindurchreicht (vgl. Fig. 5). Als seitlicher Abschluss der Elutionsvorrichtung dienen zwei paraffinierte Papierstreifen, die durch je einen längsseitig angebrachten Einschnitt verschiebbar sind. (Filterpapierstreifen aus dem für die Ionophorese verwendeten Papier werden durch flüssiges Paraffin gezogen,

²⁾ Von K. Schlögl & A. Siegel, Z. physiol. Chem. **292**, 263 (1953), für die weitere Auftrennung ausgeschnittener Flecken aus Chromatogrammen vorgeschlagen.

³⁾ Objektträger, die zusammgelegt oben eine kleine Wanne und unten eine Kante bilden, wurden von J. Sjöwall, Arkiv Kemi **8**, 320 (1955), zur Elution von Chromatogrammausschnitten verwendet.

dann wird der Überschuss an Paraffin zwischen zwei Filterpapieren ausgeplättet.) Zur Elution werden der Ionophoresestreifen auf die hintere Glasplatte A gelegt (vgl. Fig. 6) und die zwei paraffinierten Streifen bündig angeschlossen. Die vordere Glasplatte B wird nun durch die längliche Öffnung über die Streifen gebracht und durch die Schraubmutter festgepresst (vgl. Fig. 7). Die seitliche Aussparung an beiden Glasplatten passt in die U-förmig angeordneten Klötzchen, welche an der Innenseite der aus Plexiglas konstruierten Haltevorrichtung angebracht sind (vgl. Fig. 8). Die Wanne wird nun mit dem Elutionsmittel gefüllt und der Ionophoresestreifen in derselben Weise eluiert, wie in der früheren Mitteilung¹⁾ beschrieben. Sollte der Druck der zwei Schrauben für die Erzeugung eines langsamen Elutionsstromes nicht genügen, so kann den zwei Glasplatten durch eine weitere Klammer (z. B. Veloklammer), die in der Mitte der zwei Glasplatten angebracht wird, noch zusätzlicher Druck erteilt werden.

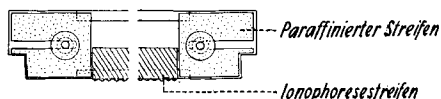


Fig. 6.
Platte A Seitenansicht

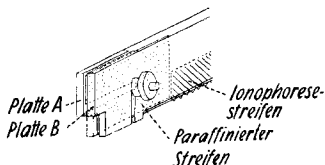


Fig. 7.

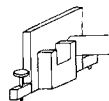


Fig. 8.
Haltevorrichtung

3. Neue Variante zur kombinierten Auftrennung auf einem Papier. Im Verlaufe weiterer Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sich bestimmte Substanzen mit verschiedensten Lösungsmitteln äusserst schwer quantitativ aus dem Papier wieder eluieren lassen. Diese Feststellung gilt vor allem für das biologisch aktive 5-Hydroxytryptamin, das sich bekanntlich auch nach Adsorption selbst an desaktivierter Kohle⁴⁾ nicht mehr quantitativ eluieren lässt. Für die Untersuchung eines Gemisches, welches schwer eluierbare Substanzen enthält, muss deshalb eine Methode angewandt werden, in welcher die zwei Trennoperationen auf einem Papier ausgeführt werden. Auf Grund früher angestellter Überlegungen¹⁾ ist die zeitliche Reihenfolge der Trennoperationen a) Ionophorese und b) Chromatographie gegeben. Im Jahre 1952 haben *Kickhöfen & Westphal*⁵⁾ eine Anordnung für die Auftrennung auf einem Papier beschrieben. Sie setzt jedoch für die ionophoretische Trennoperation die Verwendung der Ionophoreseapparatur nach *Michl*⁶⁾ voraus. Diese Methode

⁴⁾ A. Asatoor & C. E. Dalgliesh, J. chem. Soc. 1956, 2291.

⁵⁾ B. Kickhöfen & O. Westphal, Z. Naturforschg. 7b, 659 (1952).

⁶⁾ H. Michl, Mh. Chem. 82, 489 (1951).

ist wegen der Verwendung eines speziell zugeschnittenen und zusammengerollten Filterpapieres nicht ausgesprochen handlich.

Verwendet man für die ionophoretische Auftrennung eine andere als die *Michl'sche*⁶⁾ Apparatur, so bedingt dies eine Modifikation der von *Kickhöfen & Westphal*⁴⁾ beschriebenen Methodik. Als günstige und einfache Art der ionophoretischen Auftrennung im Hinblick auf die kombinierte Anwendung wurde die Anordnung, wie sie aus der Fig. 9 ersichtlich ist, gewählt. Die Dimensionen wurden den eigenen Bedürfnissen angepasst.

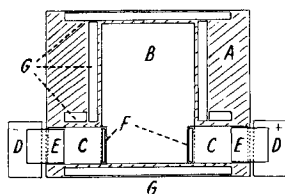


Fig. 9.

Aufsicht der verwendeten Ionophoreseapparatur

In der Mitte der (schraffierten) Glasplatte A ($55 \times 45 \times 0,6$ cm), die auf Holzklötzen aufliegt, wird ein pufferbeladenes (150% Feuchtigkeit) Chromatographiepapier B (38×25 cm) aufgespreßt. Zwei ebenfalls pufferbeladene Filterpapierstreifen C (16×15 cm) werden von den Elektrodengefäßen D auf das Chromatographiepapier B geführt. Zur Erzeugung eines homogenen, elektrischen Feldes im unteren Drittel des Chromatographiepapieres genügen diese relativ schmalen Streifen vollends. Als Stromschlüssel zwischen den Elektroden D und den Filterpapierstreifen C dienen zwei Cellophanschläuche E (20×17 cm), welche eine puffergetränkte Gaze (20×14 cm) enthalten. Zu beachten ist dabei, dass die Gaze nicht direkt auf das Papier zu liegen kommt, weil dadurch Endosmose auftreten würde, was eben durch die Cellophanschläuche verhindert wird. Das zu untersuchende Gemisch wird in der anodennahen, rechten unteren Ecke für Basen oder in der Mitte für ein Säure-Basen-Gemisch 4 cm vom unteren Rand her punktförmig aufgetragen.

Mit einer zweiten Glasplatte ($55 \times 45 \times 0,6$ cm) wird nun die beschriebene Anordnung überdeckt. Diese Platte liegt einerseits auf den Cellophanschläuchen E und den zwei Glasplättchen F ($15 \times 1 \times 0,5$ cm) und andererseits auf feuchten Filterpapierwülsten G auf. Durch ihren Druck werden die Cellophanschläuche auf die Filterpapierstreifen und die Glasplättchen F ihrerseits auf die Filterpapierstreifen und das darunterliegende Chromatographiepapier gepresst. Damit ist die Erzeugung eines homogenen, elektrischen Feldes im unteren Drittel des Chromatographiepapieres gewährleistet. Die feuchten Filterpapierwülste G bilden zwischen den zwei Glasplatten eine pufferdampfgesättigte Kammer, wodurch ein zu rasches Austrocknen von Zuführungsstreifen und Chromatographiepapier verhindert wird.

Für niedere Spannungen (bis ca. 800 V) ist dieses System ausreichend. Die Anwendung höherer Spannungen bedingt jedoch ein Kühlsystem, das die erhebliche *Joule'sche* Wärme abführt. An Stelle der gebräuchlichen Kühlvorrichtung⁷⁾, in der die Kühlflüssigkeit frei durch eine an der unteren Platte angebrachten Wanne fließt, verwendet man mit Vorteil ein System, in welchem die Kühlflüssigkeit durch ein Röhrensystem geführt wird, das seinerseits die es um-

⁷⁾ G. Werner & O. Westphal, *Angew. Chem.* **67**, 251 (1955).

gebende Flüssigkeit in der Wanne abkühlt. Trotzdem der Kühleffekt verkleinert wird, weist dieses System den grossen Vorteil auf, dass sich an der zu kühlenden Glasplatte keine Gasbläschen ansetzen, die eine homogene Kühlung verhindern.

In eigenen Versuchen wurden gute Ergebnisse erzielt mit einer Kühlvorrichtung, die bei mittleren Spannungen für sich, oder bei Verwendung höherer Spannungen in Kombination mit dem bereits erwähnten Kühlsystem verwendet werden kann. Dabei tritt an Stelle der zweiten Glasplatte, der Filterpapierwülste und der Glasplättchen eine Plastikwanne ($52 \times 40 \times 14$ cm), deren Boden aus dünnem, weichem (0,15 cm dickem) und deren Seitenwände aus festerem (0,3 cm dickem) Material⁸⁾ bestehen. Diese Wanne kann an die Wasserleitung angeschlossen werden und erfüllt so einerseits die Kühlfunktion, und andererseits erzeugt sie den für einen guten Kontakt notwendigen Druck auf das System Cellophanschläuche-Filterpapier, Filterpapier-Chromatographiepapier. Durch einen verstellbaren, unten an der Wand der Wanne angebrachten Ablauf kann einerseits das Niveau der Kühlflüssigkeit reguliert und andererseits die Wanne am Ende des Versuches entleert werden.

Bei dieser kombinierten ionophoretisch-chromatographischen Auftrennung auf einem Papier ist es nicht möglich ein Eichgemisch zu verwenden. Sind jedoch der Nullpunkt und der (von Null verschiedene) Wanderungswert nur einer Substanz bekannt, was meistens der Fall ist, so können daraus die ionophoretischen Wanderungswerte der anderen Substanzen bestimmt werden. Schlimmstenfalls kann dem Gemisch eine bestimmte Menge einer durch ihre charakteristische Reaktion bekannten Substanz zugegeben werden. Diese Methode liefert mit relativ kleiner Substanzbelastung, nämlich der Substanzmenge, die von einer punktförmigen Auftragsstelle aus ionophoretisch noch gut aufgetrennt werden kann, ausgezeichnete Resultate.

Voraussetzung für eine wirksame Chromatographie ist ein Puffer, der nicht stört. Nun ist es aber bei der chromatographischen Auftrennung, speziell von Amininen, zur Erzielung runder Flecken meist notwendig, ein mit Puffer imprägniertes Papier zu verwenden. Es zeigte sich dabei, dass Citratpuffer sowohl für die Ionophorese als auch für die Chromatographie besonders günstig ist. Ebenso wichtig wie die Wahl des Puffers ist diejenige des für beide Trennoperationen geeigneten Papiers. *Whatman*-Nr. 1-Papier erfüllt die gesuchten Bedingungen bestens.

4. Anwendungsbeispiel. Im folgenden wird das Bild der Auftrennung eines salzsauren, wässrigen Auszuges von Lebermetastasengewebe eines Dünndarmkarzinoids⁹⁾¹⁰⁾ mittels kombinierter ionophoretisch-chromatographischer Auftrennung auf einem Papier gezeigt. Die Elutionsmethode ergab bei diesem Extrakt wegen der darin vorkommenden schwer eluierbaren Substanzen keine befriedigenden Resultate. Mit Erfolg wurde jedoch die Auftrennungsmethode auf *einem* Papier angewandt. Fleck Nr. I des untersuchten

⁸⁾ Material: PVC-Trovidur rot für Wand und PVC gelb für Boden der Wanne. Hersteller: Firma *Tobler AG.*, Dornach.

⁹⁾ Das sind Tumoren, die sich von den enterochromaffinen Zellen ableiten. Sie enthalten grosse Mengen von 5-Hydroxytryptamin; *F. Lembeck*, *Nature* **172**, 910 (1953).

¹⁰⁾ Der Gewebeextrakt wurde mir in verdankenswerter Weise von Herrn Dr. *H. Langemann* aus dem Pharmakologischen Institut Zürich überlassen.

Extrakes entspricht sowohl nach den ionophoretischen und chromatographischen Wanderungswerten als auch nach seiner Anfärbbarkeit (mit verschiedensten Färbemitteln) dem 5-Hydroxytryptamin; dieses kann demnach mit der beschriebenen Methode eindeutig nachgewiesen werden.

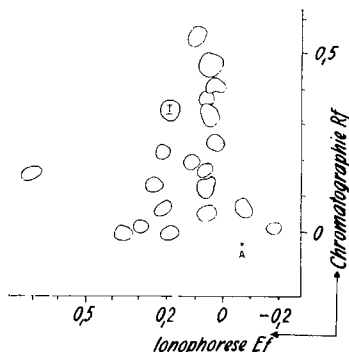


Fig. 10.

Ionophorese-Chromatogramm von 3 mm³ Extrakt¹¹⁾.

Ionophorese: 0,1-m. Na-Citratpuffer, pH 3,8: 500 V, 8 mA.

Chromatographie: aufsteigend über Nacht, Gemisch: n-Butanol:

Alkohol: Wasser:Eisessig = 8:4:3:1.

Papier: *Whatman* Nr. 1 (38 × 25 cm).

Färbung: Ninhydrin, 0,1-proz. in Aceton. A Auftragungspunkt.

Die vorliegende Arbeit konnte mit Hilfe des unserem Laboratorium zur Verfügung stehenden *Barell-Fonds* durchgeführt werden, wofür wir auch an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank aussprechen.

Bei der Ausführung der Zeichnungen war Frl. *R. Ernst* in verdankenswerter Weise behilflich.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine verbesserte und vereinfachte Elutionsvorrichtung der kombinierten ionophoretisch-chromatographischen Auftrennung auf zwei Papieren beschrieben.

2. Es wird eine neue Anordnung zur zweidimensionalen Ionophorese-Chromatographie auf einem Papier zur Auftrennung schwer eluierbarer Gemische beschrieben.

3. Es wird die Anwendung auf den salzsauren, wässrigen Extrakt aus einer Karzinoidmetastase beschrieben.

Aus dem Forschungslaboratorium
der Psychiatrischen Universitätsklinik
und der Neurologischen Universitäts-Poliklinik Basel,
Mittlerestrasse 91.

¹¹⁾ 1 g Tumorgewebe wurde bei 0° mit 4 cm³ 0,05-n. wässriger HCl homogenisiert und anschliessend zentrifugiert. 1 cm³ Extrakt entspricht 0,2 g Tumorgewebe (Feuchtgewicht).