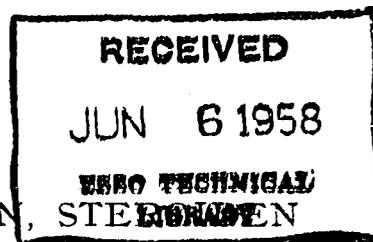


ÜBERSICHT

CHROMATOGRAPHIE VON STERINEN, STEROIDEN UND VERWANDTEN VERBINDUNGEN

TEIL B*

R. NEHER

*Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft,
Pharmazeutische Abteilung, Basel (Schweiz)*

INHALTSÜBERSICHT

IV. Papierchromatographie	205
1. Allgemeine Arbeitsmethodik	206
(a) Lösungsmittelsysteme	206
(b) Papier	211
(c) Aufbringen der Substanz	213
(d) Bedingungen der Chromatographie und Apparatives	214
(e) Nachweisreaktionen, Auswertung	216
(f) Zusätzliche Methoden zur Identifizierung	224
(g) Allgemeine Trennungsschemata	225
(h) Präparative Papierchromatographie	227
(i) Quantitative Methoden	228
2. Spezielle Methoden	230
(a) Sterine	231
(b) C ₁₈ -Steroide (Oestrogene)	232
(c) C ₁₉ -Steroide (17-Ketosteroide)	233
(d) C ₂₁ -Steroide (Corticosteroide)	237
(e) Glykoside und Aglykone (Cardenolide, Bufadienolide)	244
(f) Saponine und Sapogenine	247
(g) Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren	248
(h) Steroid-Konjugate	248
(i) Amino-Steroide und Steroid-Alkaloide	249
3. Chemische Struktur und chromatographisches Verhalten	249

IV. PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Die von CONSDEN, GORDON UND MARTIN [183] im Jahre 1944 eingeführte Papierchromatographie eignete sich in ihrer ursprünglichen Form zwar ausgezeichnet für Aminosäuren, Zucker oder andere wasserlösliche Verbindungen, nicht aber für stark lipophile Stoffe wie die Sterine und Steroide. Es gelang zwar, Steroide als wasserlösliche Derivate wie z.B. Girard-Hydrazone [190] chromatographisch in Gruppen aufzutrennen, solche Methoden erwiesen sich aber für eine allgemeine Anwendung als unbrauchbar (Notwendigkeit einer chemischen Reaktion, ungenügende Auftrennung). Erst die Einführung spezieller Lösungsmittel-Systeme durch ZAFFARONI *et al.* im Jahre 1950 [191] und BUSH im Jahre 1952 [177] sowie zahlreicher Varianten davon, machte auch die Sterine und Steroide für die Papierchromatographie allgemein zugänglich. Diese Technik hat sich in den letzten Jahren dank ihrer Einfachheit und

* Für Teil A, siehe *J. Chromatog.*, 1 (1958) 122.

Wirksamkeit in ungeahntem Ausmass entwickelt und ist heute praktisch für alle Klassen von Steroiden brauchbar. Die sinnreiche Anwendung dieser Methoden hat zugleich auch die Fortschritte auf dem Steroidgebiet wesentlich gefördert, sei es auf dem Gebiet der mikrobiologischen Reaktionen, der Isolierung und Bestimmung von Hormonen, der Phytochemie, der biosynthetischen oder auch rein synthetischen Forschung und zwar nicht nur als qualitatives und quantitatives analytisches Verfahren für Mikromengen sondern auch in präparativem Masstab. Über Theorie und Praxis der Papierchromatographie im allgemeinen sei hier auf die Literatur verwiesen [2, 80, 106, 118, 182]. Die spezielle Anwendung auf Steroide ist bereits in mehreren Übersichten behandelt worden [103, 105, 150, 179, 180, 181].

Im Folgenden werden die einschlägige Literatur sowie eigene Erfahrungen über die Arbeitsmethodik diskutiert, spezielle Beispiele aus allen wichtigen Steroid-Klassen angeführt und die Zusammenhänge zwischen Konstitution und chromatographischem Verhalten untersucht.

1. Arbeitsmethodik

Im Wesentlichen handelt es sich bei der Papierchromatographie von Steroiden um eine Verteilungschromatographie und sinngemäss gilt, was hierüber bereits in Abschnitt III B 1 ausgeführt wurde. Sehr häufig spielen aber auch Adsorptionserscheinungen eine kleinere oder grössere Rolle, je nach Art des verwendeten Lösungsmittelsystems und der zu chromatographierenden Substanzen. Unerwünschte Adsorptionserscheinungen (Schwanzbildung) lassen sich weitgehend vermeiden durch Auswahl eines Systems, in dessen beiden Phasen das Substrat eine bessere Löslichkeit aufweist, was u.a. auch durch Arbeiten bei erhöhter Temperatur bewirkt werden kann.

(a) Lösungsmittelsysteme

Geeignete Systeme stehen für alle Steroidklassen meist in grosser Auswahl zur Verfügung. Die Systeme lassen sich folgendermassen einteilen (alle Verhältnisangaben in Vol/Vol):

(1) Systeme vom ZAFFARONI-Typ (meistens wasserfrei); Die Papiere werden zuerst mit stationärer Phase imprägniert, dann mit Substanz beladen und schliesslich mit der mobilen Phase versorgt. Tab. 22 gibt eine Übersicht über solche Systeme, die in geeigneter Auswahl für alle Klassen von Steroiden verwendet werden können. Beide Phasen lassen sich beliebig kombinieren, vorausgesetzt, dass sie miteinander nicht unbegrenzt mischbar sind. Einige der am häufigsten verwendeten Systeme sind z.B. Propylenglykol/Toluol, Formamid/Benzol bzw. Benzol-Chloroform und Chloroform.

(2) Systeme vom BUSH-Typ (wässrig): Man hängt die trockenen, mit Substanz beladenen Papiere in das mit mobiler und stationärer Phase gesättigte Chromatographiergefäss, lässt einige Zeit equilibrieren, wobei das Papier die polare Phase bevorzugt adsorbiert, und entwickelt dann mit der schwach polaren mobilen Phase. Tab. 23 gibt eine Übersicht über solche Systeme die sich ebenfalls für die meisten neutralen Steroide eignen, vorzugsweise bei erhöhter Temperatur (38–40°).

TABELLE 22
LÖSUNGSMITTELSYSTEME ZAFFARONI-TYP

<i>Stationäre Phase</i> (<i>Imprägnierung der Papiere</i>)	<i>Mobile Phase</i> (<i>gesättigt mit der stationären</i>)
Propylenglykol	Hexan, Cyclohexan
Propylenglykol-Wasser	Methylcyclohexan
Propylenglykol-Äthylenglykol	Petroläther, Ligroin
Äthylenglykol	Decalin
Cellosolve (Äthylenglykol-monoäthyläther)	Benzol, Benzol-Cyclohexan, Benzol-Chloroform
Phenylcellosolve (Äthylenglykol-monophenyläther)	Benzol-Äthylacetat, Dichlorbenzol
Carbitol (Diäthylenglykol-monoäthyläther)	Xylol, Xylol-Methyläthylketon
1,3-Butandiol	Methylenchlorid
Glycerin	Chloroform
Formamid	Chloroform-Tetrahydrofuran
Benzylalkohol	Aceton
Wasser	Methyläthylketon
	Butanol, Amylalkohol

TABELLE 23
LÖSUNGSMITTELSYSTEME BUSH-TYP

<i>Stationäre Phase</i>	<i>Mobile Phase</i>
Methanol-Wasser <i>tert.</i> -Butanol-Wasser	Hexan, Cyclohexan, Heptan, Isooctan, Petroläther, Benzol Toluol, Isopropyläther, Äthylacetat

Häufig verwendete Systeme dieser Art sind z.B.

Bush A	(Heptan-Methanol-Wasser 5:4:1)
B ₅	(Benzol-Methanol-Wasser 2:1:1)
C	(Toluol-Essigester-Methanol-Wasser 9:1:5:5)
E ₂ B	(Isooctan- <i>tert.</i> -Butanol-Wasser 10:5:9)

(3) Wässrige Systeme im klassischen Sinn, ohne spezielle Imprägnierungs- oder Equilibrierungstechnik, besonders für stark polare oder ionische Steroide. Tab. 24 bis 26 geben eine Auswahl von neutralen, sauren und basischen Systemen.

TABELLE 24
WÄSSRIGE NEUTRALE LÖSUNGSMITTELSYSTEME
z.B. für Herzglykoside und Aglykone, Saponine, Sapogenine, Aminosteroide etc.

<i>Stationäre Phase</i>	<i>Mobile Phase</i>
Wasser	Isooctan, Ligroin
Methanol	Benzol, Toluol, Xylol
Äthanol	Chloroform
Butanol	Tetrachlorkohlenstoff
Isoamylalkohol	Butanol und höhere Alkohole
	Dioxan

TABELLE 25

WÄSSRIGE SAURE LÖSUNGSMITTELSYSTEME

z.B. für Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren, Steroidkonjugate, Saponine, Steroidalkaloide etc.

<i>Stationäre Phase</i>	<i>Mobile Phase</i>
Ameisensäure-Wasser	Heptan
Essigsäure-Wasser	Toluol
Salzsäure-Wasser (mit oder ohne Zusatz von Alkoholen bzw. auf KCl-imprägniertem Papier)	Isopropyläther, Butyläther Tetrachlorkohlenstoff Äthylacetat Alkohole, besonders Butanol

TABELLE 26

WÄSSRIGE BASISISCHE LÖSUNGSMITTELSYSTEME

z.B. für Oestrogene, Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren, Steroidkonjugate, Saponine etc.

<i>Stationäre Phase</i>	<i>Mobile Phase</i>
Wasser	Benzol, Toluol, Xylol
<i>N</i> -Natronlauge	Chloroform
verd. Ammoniumhydroxyd	Isoamylalkohol
Äthanolamin	Pyridin, Collidin (+ NH ₃)
Carbonatpuffer	
Natriumbarbituratpuffer	

TABELLE 27

SYSTEME FÜR DIE CHROMATOGRAPHIE MIT UMGEKEHRTEN PHASEN

<i>Hydrophobierung der Cellulose mit</i>	<i>Stationäre Phase</i>	<i>Mobile Phase</i>
Vaseline	Alkohol	Wasser [192]
Paraffinöl, Kerosen (5-10% in Petroläther)	Methanol Äthanol <i>n</i> -Propanol	Wasser [193] Wasser [194] verd. Ammoniak [194] Wasser [195] Methanol, Wasser [193]
	Cellosolve Chloroform	Propanol, Methanol [193] Essigsäure [196, 197]
Petroleum (10-40% in Petroläther)	Alkohole	Wasser [198]
Silikon (5-10% in Cyclohexan)	Hexan, Benzol Cyclohexan Chloroform	Methanol, Wasser [199, 200] Äthanol, Wasser [201] Methanol, Wasser [203]
Al-Seife	Tetrachlorkohlenstoff	Methanol, Wasser [204]
Quilon	Methylcellosolve	Alkohole, Wasser [202, 205]
	Pentanol, Octanol, Dicarbonsäureester Heptanol	Formamid, Wasser [248] Wasser [206, 207]

Gelegentlich werden auch monophasische Systeme benützt, wie z.B. das wasserfreie: Benzin-Chloroform-Essigsäure (100:4-40:1-4) für Sapogenine [370], wobei sich allerdings mit der Cellulose zusammen biphasische Systeme ausbilden.

(4) Systeme für die Chromatographie mit umgekehrten Phasen (reversed phase). Sie dienen für verschiedene Steroidklassen, häufig für die sehr schwach polaren. Tab. 27 gibt einen Überblick über solche Möglichkeiten, wobei die Cellulose zuerst durch verschiedene Imprägnierungen hydrophobiert werden muss, damit die schwächer polare Phase als stationäre dienen kann.

Beim Arbeiten mit all diesen Lösungsmittelsystemen ist es selbstverständlich, dass alle nicht mischbaren Phasen bei Arbeitstemperatur gegenseitig gesättigt sein müssen.

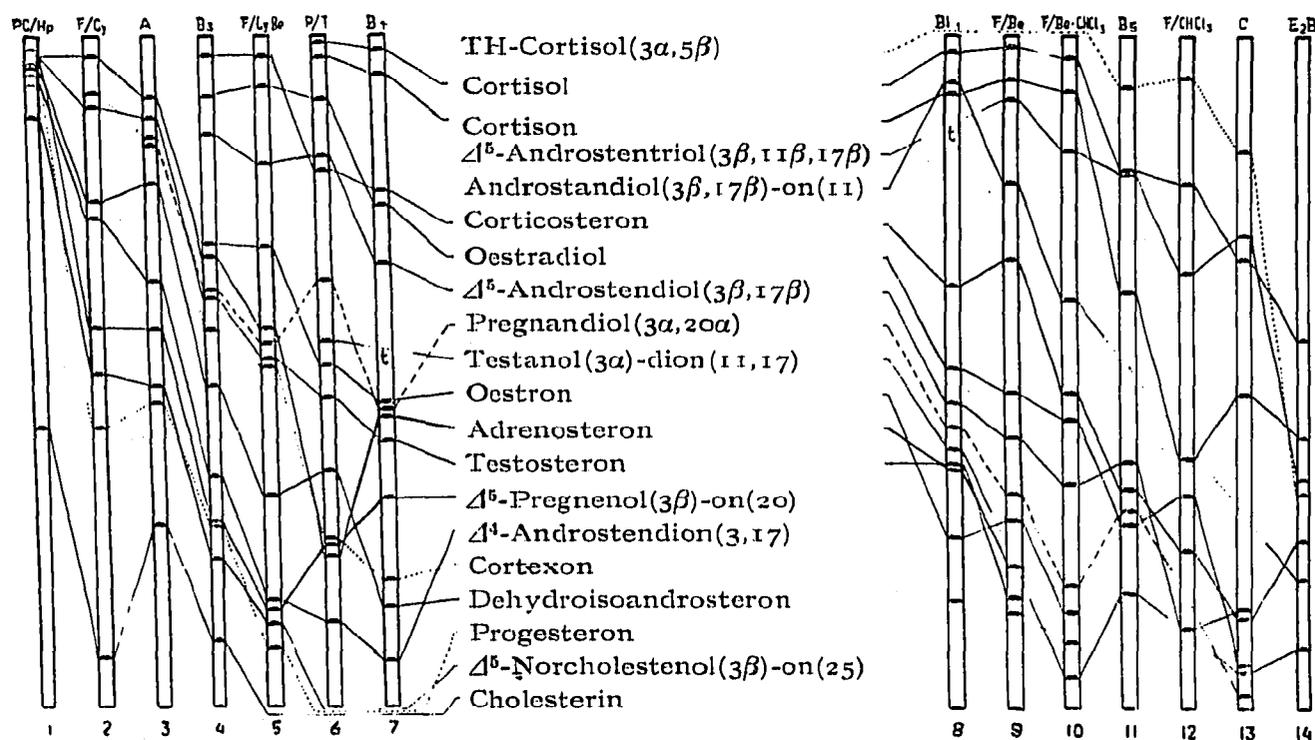


Fig. 4. Mittlere R_F -Werte von 20 Steroiden mit abnehmender Polarität von oben nach unten in 14 "Standard"-Lösungsmittelsystemen, deren Polarität von links nach rechts zunimmt (Temp. 22°, Whatman Papier No. 1, absteigend). t = tailing. 1. Phenylcellosolve/Heptan; 2. Formamid/Cyclohexan; 3. Bush A (Heptan-Methanol-Wasser 5:4:1); 4. Bush B₃ (Petroläther-Benzol-Methanol-Wasser 33:17:40:10); 5. Formamid/Cyclohexan-Benzol (1:1); 6. Propylenglykol/Toluol; 7. Bush B₁ (Petroläther-Toluol-Methanol-Wasser 5:5:7:3); 8. Petroläther-Benzol-Methanol-Wasser (3:7:5:5); 9. Formamid/Benzol; 10. Formamid/Benzol-Chloroform (1:1); 11. Bush B₅ (Benzol-Methanol-Wasser 2:1:1); 12. Formamid/Chloroform; 13. Bush C (Toluol-Äthylacetat-Methanol-Wasser 9:1:5:5); 14. Isooctan-*tert.*-Butanol-Wasser (10:5:9).

Um sich in dieser Vielfalt besser zurechtfinden zu können, sind z.B. in Fig. 4 die Laufstrecken (R_F -Werte) von 20 Steroiden (Tetrahydrocortisol bis Cholesterin) deren Polarität von oben nach unten abnimmt, in 14 bewährten "Standard"-Lösungsmittelsystemen, deren Polarität von links nach rechts zunimmt (Phenylcellosolve/Heptan bis E₂B), übersichtlich zusammengestellt. Dieses Schema erlaubt

TABELLE 28
ZAFFARONI-SYSTEME FÜR VERSCHIEDEN POLARE STEROIDE [178]

Lösungsmittelsystem	$C_{10}O_2$	$C_{21}O_3$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$	$C_{21}O_6$	$\underbrace{C_{21}O_3 \quad C_{21}O_4 \quad C_{21}O_5}_{21\text{-Monoacetate}}$			$\underbrace{C_{21}O_4 \quad C_{21}O_5}_{Diacetate}$	
	$C_{21}O_2$									
Formamid/Hexan	×	×				×			×	
Propylenglykol/Hexan	×	×				×			×	
Formamid/Hexan-Benzol (1:1)	×	×	×				×	×		×
Propylenglykol/Hexan-Benzol (1:1)	×	×	×				×	×		×
Formamid/Benzol		×	×	×				×		
Propylenglykol/Benzol		×	×	×				×		
Propylenglykol/Toluol		×	×	×				×		
Formamid/Chloroform			×	×	×					

TABELLE 29
BUSH-SYSTEME VERSCHIEDENER POLARITÄT [177, 181]

Petroläther-Methanol-Wasser	(100:96:4)	
Petroläther-Methanol-Wasser	(100:85:15)	
Petroläther-Methanol-Wasser	(100:80:20)	= A
Petroläther-Methanol-Wasser	(100:70:30)	
Petroläther-Toluol-Methanol-Wasser	(25:25:35:15)	= B ₁
Petroläther-Toluol-Methanol-Wasser	(33:17:30:20)	= B ₂
Petroläther-Benzol-Methanol-Wasser	(33:17:40:10)	= B ₃
Toluol-Methanol-Wasser	(100:75:25)	
Toluol-Methanol-Wasser	(100:50:50)	= B ₄
Benzol-Methanol-Wasser	(100:55:45)	
Benzol-Methanol-Wasser	(100:50:50)	= B ₅
Benzol-Methanol-Wasser	(100:40:60)	
Toluol-Äthylacetat-Methanol-Wasser	(90:10:50:50)	= C
Benzol-Chloroform-Methanol-Wasser	(66:33:50:50)	
Benzol-Chloroform-Methanol-Wasser	(50:50:50:50)	
Xylol-Methanol-Wasser	(100:85:15)	
Xylol-Methanol-Wasser	(100:70:30)	

u.a. die rasche Auswahl geeigneter Systeme für ein Steroid mit annähernd bekannter Polarität (Anzahl der Hydroxyl- und Keto-Gruppen, Doppelbindungen). Ein weiteres Schema ist in Tab. 28 angegeben, allerdings nur für ZAFFARONI-Systeme [178]. Hingegen enthält Tab. 29 eine Auswahl von BUSH-Systemen [177, 181]. Ihre Verwendbarkeit lässt sich durch einen Vergleich mit den in Fig. 4 angeführten BUSH-Systemen sinngemäss ableiten.

Die relative Wandergeschwindigkeit (R -Wert) der Steroide ist in den verschiedenen Systemen, da in erster Linie von der Polarität abhängig, meistens die gleiche. Es gibt aber immer wieder Fälle, in welchen R_F -Werte durch Effekte von Adsorption, Verdrängung oder Wasserstoffbrückenbindung in einzelnen Systemen individuelle Verschiebungen erfahren, welche für die Charakterisierung von Steroiden besonders wertvoll sind. Darum ist es unbedingt empfehlenswert, sowohl ZAFFARONI- als auch BUSH-Systeme zu verwenden. Im Folgenden sei noch auf einige Unterschiede zwischen beiden Typen hingewiesen, die bei der praktischen Ausführung eine Rolle spielen:

	Lösungsmittelsysteme, Typ	
	Zaffaroni	Bush
Beladungskapazität	grösser	geringer
Eignung für den präparativen Chromatoblock	sehr gut	nicht möglich
Verdrängungseffekte	gelegentlich vorhanden	nicht beobachtet
Empfindlichkeit auf Temperaturschwankungen	mässig	ziemlich gross, meist erhöhte Temp. erforderlich
Trocknung der Chromatogramme	langwierig bei Raumtemperatur, sonst erhöhte Temp. erforderlich. Reste der stationären Phase schwierig aus dem Papier zu entfernen	sehr leicht bei Raumtemperatur

Wie bereits in früheren Abschnitten betont, müssen alle Lösungsmittel von hohem Reinheitsgrad und gleichbleibender Qualität sein. Zur Reinigung (Neutralwaschen, Destillieren etc.) vgl. Abschnitt III A 3. Verschiedene Lösungsmittel "Zur Chromatographie" sind im Handel erhältlich (z.B. Formamid, Merck) und können ohne weitere Reinigung verwendet werden. Alle Lösungsmittelsysteme sollen in nicht zu langen Zeitabständen immer wieder frisch bereitet werden. Chemische Veränderungen sind in gewissen Fällen möglich.

(b) Papier

Es steht eine ganze Reihe geeigneter Filterpapiere zur Verfügung. Ausser den wohl am häufigsten verwendeten Whatman No. 1 und Schleicher & Schüll 2043 b (vgl. [209]) haben sich noch viele andere Sorten für die Steroidchromatographie, teils für Spezialzwecke, als brauchbar erwiesen, wie z.B. Whatman No. 2, 3 MM, 4, 7, 31, 54, 542, Schleicher & Schüll 2040 b, 2043 a, Munktell 20, 150 G, Eaton & Dikeman 613, Durrieux 122, d'Arches 1030, Macherey & Nagel 63. Man verwendet entweder lose oder zusammenhängende Streifen, wie sie ursprünglich von ZAFFARONI *et al.* [191] angegeben wurden (vgl. auch [210, 211] und Fig. 5 u. 6) oder ganze Blätter, deren Dimensionen sich einerseits nach den Originalbögen, andererseits nach der Grösse der Chromatographiergefässe richten. Die Streifen haben den Vorteil, dass die seitliche Diffusion unterbunden ist und somit der seitliche Abstand parallel zu chromatographierender Substanzen kleiner gehalten werden kann als auf Blättern. Hingegen können bei starker Beladung der Streifen störende Randeefekte auftreten. Wir verwenden mit gutem Erfolg für analytische Chromatogramme stets ausgestanzte Whatman 1 Streifen von 1.5 cm Breite (übrige Dimensionen s. [210] und Fig. 5) und für präparative Chromatogramme 19 cm breite Blätter mit 17 cm langer Startlinie, und zwar so, dass die Chromatographie senkrecht zur Maschinenrichtung des Papiers erfolgt. Normalerweise werden die Papiere ungewaschen zur Chromatographie verwendet. Für manche präparative Zwecke oder besonders dann, wenn Eluate von Chromatogrammen zur quantitativen Auswertung gelangen, wäscht man die Papiere vor der Chromatographie entweder mit dem nachher zu verwendenden Lösungsmittelsystem bzw. einzelnen Lösungsmitteln im Durchlauf während mehrerer Tage oder im Soxhletextraktor (vgl. z.B. [210, 212]).

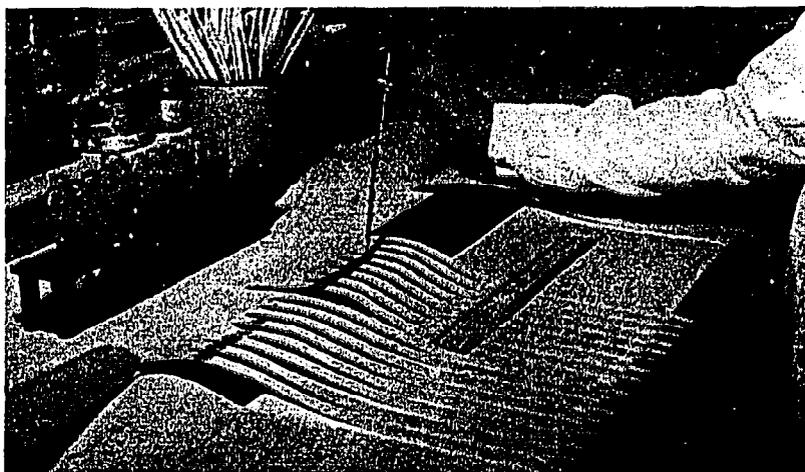


Fig. 5. Aufbringen der Substanzlösungen auf Streifen und Blätter.

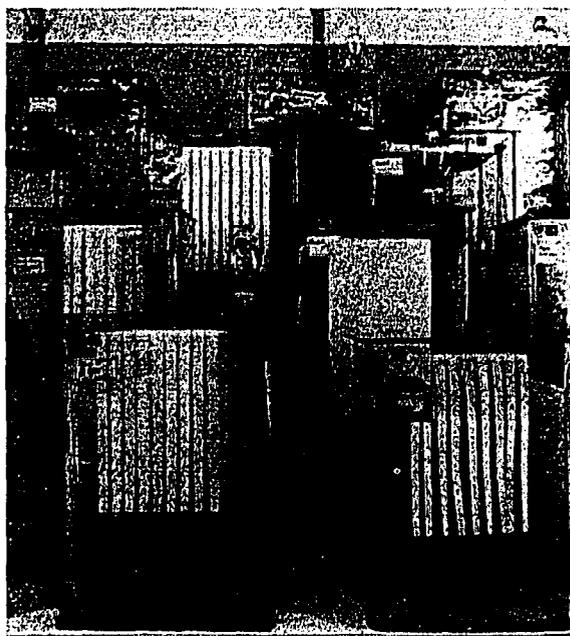


Fig. 6. Komplette Gefäße für die Papierchromatographie.

Vorbehandlung der Papiere

(1) Für die Systeme vom ZAFFARONI-Typ (Tab. 22) ist es nötig, das Papier mit der stationären Phase zu imprägnieren. Dies geschieht am einfachsten durch rasches Durchziehen der Streifen oder Blätter durch eine 20–50%ige Lösung des Imprägniermittels in Methanol, Aceton oder Chloroform. Nach 5–10 Minuten Hängen (ziemlich gleichgültig in welcher Richtung, am besten in einem Abzug) ist das flüchtige Lösungsmittel verdampft (Achtung bei sehr hoher Luftfeuchtigkeit, wegen übermässiger Kondensation von Wasser infolge der Verdampfungskälte), und das beladene Papier ist zur Aufnahme der Substanzen bereit. Letztere Operation sollte in diesem Fall nicht zuviel Zeit in Anspruch nehmen (weniger als eine halbe Stunde), da sonst auch zuviel Im-

Literatur S. 252/258.

prägniermittel abdunstet. (Volumenabnahme der stationären Phase, daher Zunahme der R_F -Werte!) Andererseits ist bei Eintauchen des Papiere in unverdünntes Imprägniermittel und nachherigem Abpressen zwischen Gummiwalzen oder Filtrierpapier meist noch soviel stationäre Phase vorhanden, dass die Substanzen bei der Chromatographie nur sehr langsam wandern. Hierbei ist auch die Struktur der Papiere zu berücksichtigen; dichte nehmen weniger stationäre Phase auf als lockere [209]. Für Chromatogramme vom ZAFFARONI-Typ verwenden wir stets 20- oder 30%ige Lösungen des Imprägniermittels in Aceton [213].

(2) Imprägnierung mit Adsorbentien. Beim Versuch, die Vorteile von Adsorption und Papierchromatographie zu vereinigen, imprägnierte man das Papier entweder mit Aluminiumoxyd [177, 214, 215] oder mit Kieselsäure [192], verlor dadurch aber gerade alle Vorteile der Verteilungschromatographie. Die Trennungen sind im allgemeinen nicht überzeugend und schwer reproduzierbar, sodass hier nicht weiter darauf eingegangen wird. (vgl. jedoch [389]).

(3) Hydrophobierung des Papiere. Der Zweck dieser Massnahme ist die Chromatographie mit umgekehrten Phasen, das heisst mit der unpolaren als stationärer und der polaren als mobiler Phase (vgl. III B 1) z.B. für extrem lipophile Steroide. Dies erreicht man am einfachsten durch Imprägnieren mit Paraffinöl, Petroleum, Vaseline oder Silikonen (vgl. Tab. 27). Silikon-imprägnierte Papiere sind übrigens im Handel erhältlich (Schleicher & Schüll 2043 a Mgl hy u. 2043 b Mgl hy). Gelegentlich sind auch höhere Alkohole, Aluminiumseifen, Quilon (Chromsäure-Stearinsäure-Komplex) oder Gummi verwendet worden; allerdings scheinen die letzteren Spezial-Systeme einen sehr beschränkten Anwendungsbereich zu haben. Eine weitere Möglichkeit der Hydrophobierung ist die Acetylierung des Papiers [216]. Dies ist ein relativ umständliches Verfahren und die acetylierten Papiere des Handels scheinen zur Zeit noch nicht befriedigend zu sein. Die meisten Trennungen auf dem Steroidgebiet, die mit Hilfe acetylierter Papiere durchgeführt werden können, sind jedoch mit weniger Aufwand auch mit gewöhnlichem Papier und geeigneten Systemen erreichbar.

(c) *Ausbringen der Substanz*

Die Substanzmenge richtet sich nach dem Zweck der Chromatographie, nach der Löslichkeit der Substanz in dem gegebenen Lösungsmittelsystem und nach der Nachweisbarkeit der Substanz auf dem Chromatogramm. Für die übliche papierchromatographische Analyse eignen sich am besten Mengen von 5–20 γ , gelöst in 5–10 μ l Lösungsmittel, die mit einer Mikropipette auf den Startplatz (Durchmesser 5–15 mm) getropft werden. Bei guter Nachweisbarkeit kann man mit Mengen bis hinunter zu etwa 0.25 γ operieren, bei guter Löslichkeit bis hinauf zu etwa 1000 γ pro 1.5 cm breiten Streifen. Kleine Substanzmengen erlauben natürlich bessere Trennungen, oft ist man aber zwecks Nachweis kleiner Verunreinigungen zum Einsatz grosser Mengen gezwungen. Für präparative Chromatogramme verwendet man die gleiche Substanzmenge pro cm Startlinie wie sie sich aus analytischen Vorversuchen als optimal hinsichtlich Trennung und Beladungskapazität ergeben. Für das Auf-

tropfen der Substanzen legt man die Papiere so über eine U-förmige Holzleiste, dass die Auftropfstelle über den Hohlraum zu liegen kommt (Fig. 5).

Als Lösungsmittel für die aufzutropfenden Substanzen dienen u.a. Aceton, Chloroform, Methanol oder vorteilhaft Chloroform-Methanol (1:1). Standardlösungen bewahrt man am besten in einem nicht zu flüchtigen Lösungsmittel wie Methanol in einer Konzentration von etwa 0.2–1% in Doppelschliffgläschen (s. Fig. 5) in der Kälte und nicht länger als einige Wochen auf.

Als Mikropipetten dienen solche mit 50–100 μl Fassungsvermögen und μl -Graduierung. Für Spezialzwecke können genau geeichte Ultramikropipetten oder z.B. die Agla Mikrometersyringe verwendet werden, allerdings unter recht erheblichem Zeitaufwand. Das Auftragen für analytische Chromatogramme erfolgt am einfachsten punktförmig und für präparative strichförmig, wobei man z.B. den Inhalt einer 100 μl -Pipette über eine 17 cm-Startlinie gleichmässig auslaufen lässt. Das Anblasen der Auftropfstelle von unten mit Luft zur Beschleunigung der Trocknung ist bei Verwendung organischer Lösungsmittel normalerweise nicht erforderlich. Über eine spezielle, aber nur beschränkt anwendbare Methodik zur Auftragung grösserer Volumina vgl. [177], über eine solche mit kombinierter Vorreinigung [217]. Es empfiehlt sich meistens, parallel zu den zu analysierenden Gemischen, Fraktionen oder Substanzen bekannte Standardsubstanzen in Form von Steroiden, Farbstoffen oder anderen Verbindungen mitlaufen zu lassen, ferner einen stark lipophilen Farbstoff wie Sudan III oder IV, der mit der Lösungsmittelfront läuft und sie deutlich markiert.

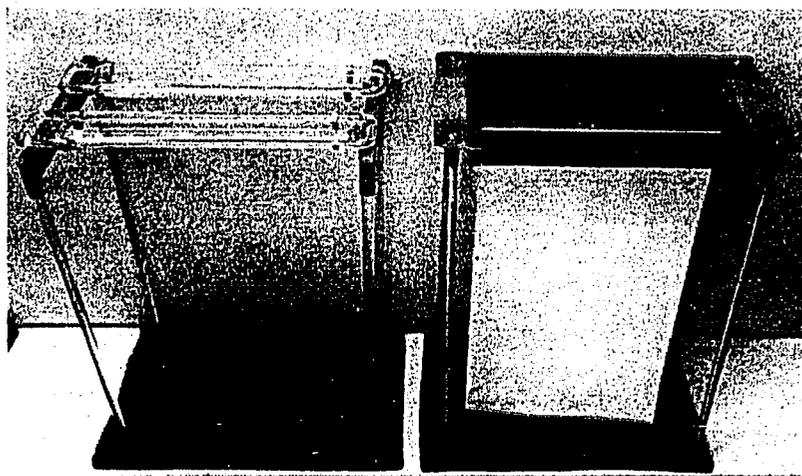


Fig. 7. Tröge aus Glas und rostfreiem Metall.

(d) Bedingungen der Chromatographie und Apparatives

Es kann auf- oder absteigend chromatographiert werden; letztere Technik ist vorteilhafter, da sie bei einem gegebenen System durch beliebige Variation der Chromatographiedauer von wenigen Stunden bis mehreren Tagen die Erreichung einer gewünschten oder notwendigen Wegstrecke erlaubt. Alle Chromatogramme sind bei möglichst konstanter Temperatur auszuführen, besonders wenn BUSH-Systeme verwendet werden. Für alle Lösungsmittelsysteme dienen die sonst bei der Papierchromatographie
Literatur S. 252/258.

graphie üblichen Gefässe, die gegenüber den Lösungsmitteln resistent und dicht verschliessbar sein müssen. Sie sollen im Verhältnis zur Chromatogramfläche kein zu grosses Volumen haben, da dies die Sättigung und Lösungsmitteldämpfen erschwert. Einwandfreie Resultate liefern z.B. die in Fig. 6 wiedergegebenen einfachen und gute Sicht gestattenden Glasgefässe (rechteckige Batteriegläser) mit geschliffenem Rand und aufgeschliffenem Glasdeckel. Silikon Hochvakuumfett dient als Dichtungsmittel. Eine ebenfalls sehr einfache Vorrichtung (Fig. 7) trägt Glas- oder Metalltröge (horizontalisiert!), in welche die präparierten Papierstreifen oder Blätter eingehängt werden. Die in Fig. 7 gezeigten Metalltröge aus rostfreiem Blech (mit 10 Schlitzern, [218]) haben den Vorteil, sehr platzsparend zu sein (100 Streifen oder 10 Blatt pro Trog). Bei den

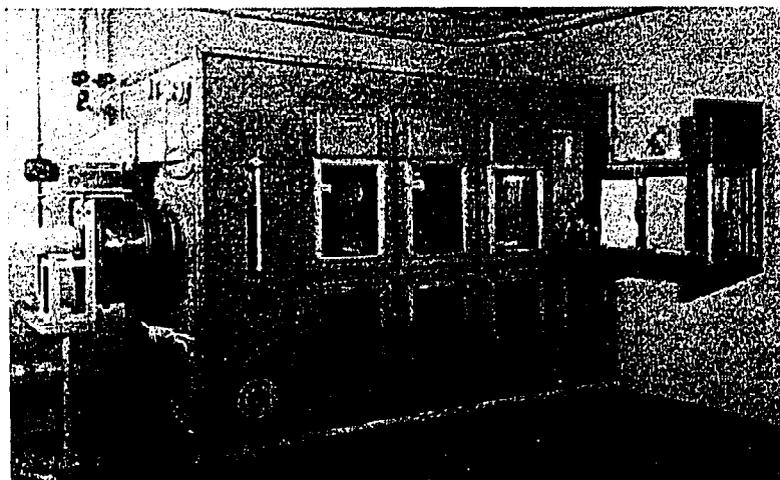


Fig. 8. Wärmeschrank mit Luftumwälzung und Schubladen.

Systemen vom BUSH-Typ werden die mit Substanzen beladenen Papiere in den trockenen Trog gehängt und im geschlossenen, mit Lösungsmitteldampf gesättigten Gefäss 6–12 Stunden equilibriert (die Dauer hängt u.a. von der Papiermenge ab); die Sättigung der Gefässe wird durch seitliche Papiere gefördert, von denen eines mit stationärer, das andere mit mobiler Phase getränkt ist. Nach der Equilibrierungsperiode lässt man durch eine Öffnung im Deckel aus einem Tropftrichter die nötige Menge mobiler Phase in den Trog einlaufen, worauf die Chromatographie beginnt. Nach 2–3 Stunden hat die Lösungsmittelfront das untere Papierende erreicht. Nach dieser oder gegebenenfalls späterer Zeit (in letzterem Fall kann man das Eluat sammeln) nimmt man das Chromatogramm heraus und hängt es zum Trocknen auf. Equilibrierung und Chromatographie haben bei der gleichen Temperatur zu erfolgen; bei Temperaturen zwischen 35 und 40° erhält man mit den BUSH-Systemen meistens kleinere und besser begrenzte Flecken und daher bessere Trennungen als bei Raumtemperatur. Für die Chromatographie bei höherer Temperatur verwendet man z.B. Brutschränke, spezielle Wärmetruhen, geheizte Räume. Hinsichtlich hygienischer und betriebssicherer Ausführung hat sich ein spezieller Schubladenschrank mit Warmluftumwälzung auch für grosse Mengen von Chromatogrammen bestens bewährt (Fig. 8 [36]).

Bei den Systemen vom ZAFFARONI-Typ wird das mit stationärer Phase und Sub-

stanzen beladene Papier direkt in den mit mobiler Phase gefüllten Trog eingeführt und die Chromatographie beginnt ohne Equilibrierungszeit in dem mit mobiler Phase gesättigten Gefäss sofort. Über eine aufsteigende Anordnung zur fraktionierten Papierchromatographie vgl. z.B. [219]. Dieses etwas umständliche Verfahren dürfte für eine allgemeine Anwendung weniger in Frage kommen.

Nach der gewünschten Zeit nimmt man die fertigen Chromatogramme aus dem Gefäss und hängt sie, vor Licht, besonders UV-Licht geschützt [220, 221], am besten in einem Abzug am unteren oder oberen Rand zum Trocknen bei Raumtemperatur auf. Unimprägnierte Papiere sind in $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde ausreichend getrocknet, imprägnierte lässt man entweder 12–14 Stunden im schwachen Luftzug hängen oder man trocknet sie nach einer kurzen Vortrocknung an der Luft im Trockenschrank 20–40 Minuten lang bei 80–90° unter Absaugen der Dämpfe. Reste von Imprägniermitteln bleiben stets hartnäckig im Papier zurück. Während man Chromatogramme, die anschliessend mit Farbreaktionen ausgewertet werden, möglichst gut trocken soll, da Rückstände z.B. besonders von Formamid die Bildung von Farben oder Fluoreszenzen oft beeinträchtigen können, so ist dies für Chromatogramme, von welchen die Substanzen wieder eluiert werden sollen, meist nicht erforderlich; im Gegenteil, die Elution ist leichter, wenn das Papier vorher nicht völlig getrocknet wurde; das restliche Imprägniermittel lässt sich *in vitro* im Hochvakuum relativ gut entfernen. Sollte es sich ausnahmsweise um sauerstoffempfindliche Verbindungen handeln, kann man die Chromatogramme in einer heizbaren Kammer unter Durchleiten von inertem Gas trocknen [179], was jedoch meist langwierig ist.

(e) Nachweisreaktionen und Auswertung der Chromatogramme

Für die papierchromatographische Analyse der farblosen Steroide ist das Auffinden einer empfindlichen Nachweisreaktion ebenso wichtig wie ein gutes Lösungsmittelsystem. Glücklicherweise sind bereits eine grosse Zahl ausgezeichneter Indikatoren oder Reagentien für diesen Zweck bekannt, welche den Nachweis fast aller Steroidklassen erlauben. Es gibt zwar verschiedene Indikatoren, die spezifisch auf einzelne chemisch definierte Gruppierungen ansprechen, aber es gibt natürlich keine, die für ein oder mehrere Steroide streng spezifisch sind. Im Folgenden wird eine Zusammenstellung der für Steroide und verwandte Verbindungen brauchbaren Nachweisreaktionen gegeben. Man sollte stets daran denken, dass gelegentlich gewisse Steroide oder Verunreinigungen ohne jegliche Behandlung auch durch Eigenfluoreszenz im UV-Licht (ca. 360 m μ) nachweisbar sein können. Für die Behandlung mit Reagenzien ziehen wir, wenn immer möglich, das Eintauchen der Chromatogramme (rasches, sorgfältiges Durchziehen durch das Reagens in flacher Schale) dem Besprühen vor.

(1) UV-Absorption.

(a) bei 240 m μ für Steroide mit α,β -ungesättigter Oxogruppe. Es ist sehr empfehlenswert, alle Chromatogramme mit Verdacht auf UV-absorbierende Steroide vor Ausführung von Farbreaktionen im UV zu photokopieren [46, 139, 149, 177, 222, 223, 224] oder im Fluoreszenzschirm [46, 149, 218, 224] zu prüfen. Für die Photokopie

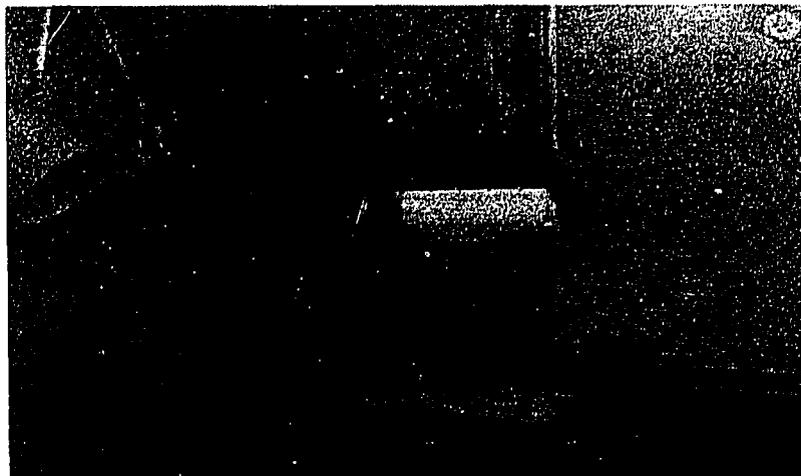


Fig. 9. Vorrichtung zur UV-Photokopie.

(Anordnung vgl. z.B. Fig. 9) dient als Lichtquelle eine keimtötende Lampe mit Hauptstrahlung bei $253.7\text{ m}\mu$. Das Chromatogramm wird über ein geeignetes, sehr hartes Photopapier (Kodagraph Contact Standard Paper, Ilford reflex paper No. 50, Agfa Copex C, Tellko etc.) gespannt, eventuell mit Hilfe einer Polyäthylenfolie; dann wird wenige Sekunden belichtet, entwickelt und fixiert, und der permanente Beleg zeigt nun die UV-absorbierenden Steroide als weisse Flecken oder Banden auf schwarzem Grund an (s. Fig. 10). Eine etwas kompliziertere Belichtungsvorrichtung findet sich in [222]. Die Empfindlichkeit geht etwa bis $0.5\ \gamma\ \alpha,\beta$ -ungesättigtes Ketosteroid/cm². Dem gleichen Zweck dient der Fluoreszenzschirm (s. Fig. 11 [218]),

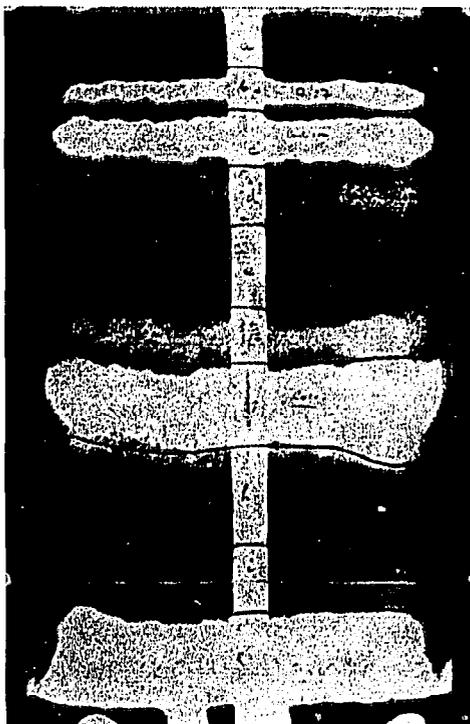


Fig. 10. UV-Photokopie eines präparativen Blattes aus dem Chromatoblock.

der anstatt des Photopapieres eine bei $253.7\text{ m}\mu$ grün fluoreszierende Scheibe besitzt. Die auf dem zwischen Lichtquelle und Schirm liegenden Chromatogramm befindlichen UV-absorbierenden Steroide verursachen daher dunkle Stellen auf dem Schirm, die man direkt auf dem Chromatogramm von hinten anzeichnen kann.

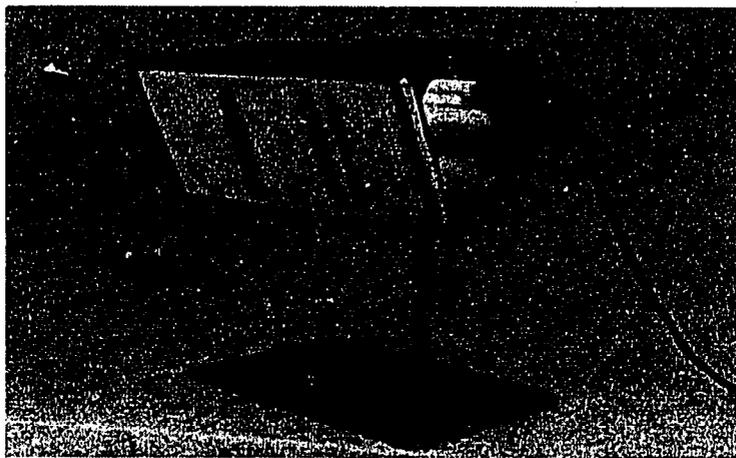


Fig. 11. Fluoreszenzschirm mit Chromatogramm.

(b) Für die UV-Photokopie bei $300\text{--}340\text{ m}\mu$ für den Cumalinring der Scilla- und Bufo-Glykoside und Aglykone [225] verwendet man gefiltertes Licht der Quecksilberdampfampe; für diejenige bei $280\text{ m}\mu$ für Östrogene dient z.B. Magnesiumlicht [226].

(2) *m*-Dinitrobenzol (DNB) und Alkali (Reaktion nach ZIMMERMANN bzw. RAYMOND) für 17-Ketosteroide, Herzglykoside und Aglykone (Butenolide).

(a) Durchziehen der Streifen durch eine frische Mischung gleicher Teile von (1) 3 g DNB in 190 ml Methanol + 10 ml Propylenglykol und (2) 2.5 g KOH in 20 ml Methanol + 5 ml Wasser [227].

(b) 2.5% DNB in Chloroform, tauchen, trocknen, dann Spray mit 5% KOH in Methanol [228].

(c) 10% DNB in Benzol, Spray, dann besprühen mit einer Lösung von 6 g NaOH in 25 ml Wasser und 45 ml Methanol [229].

(d) Frisch gemischte Lösung von 1 Vol. 2% DNB in Äthanol + 1 Vol. 30% KOH in Äthanol [230] oder 2 Vol. 1% DNB in Methanol + 1 Vol. 15% KOH [231].

(e) 2.5 N-KOH in Äthanol, eintauchen, dann in eine Lösung von 2% DNB in Äthanol tauchen, trocknen bei 65° [232].

17-Ketone geben eine violette Färbung (Grenze ca. $2\text{--}5\text{ }\gamma/\text{cm}^2$). Andere Farben, aber viel schwächere mit 3-Ketonen (blau-blauviolett), 16-Ketonen (gelblich-braun, [230, 232]), 20-Ketonen (bräunlich-violett, [232]), intensiver wieder mit $\Delta^4\text{-}3,6$ -Diketonen (orange-gelb-blau-grün-braun-grün; spezifisch?) [180]. Nach Verwendung gewisser Lösungsmittelsysteme zeigen die Chromatogramme eine Tendenz zur Braunfärbung [89].

(3) 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) für Steroide mit reaktiven Ketogruppen [324].

(a) Durchziehen der Streifen durch eine Lösung von 3 g DNPH in 900 ml Me-

Literatur S. 252/258.

thanol + 3 ml conc. HCl; 5 Min. trocknen bei 90°, waschen mit 2 N-NaOH, 2 N-HCl und Wasser (3 mal) [36].

(b) 300 mg in 5–6 ml Äthanol + 0.3 ml conc. H₂SO₄ erhitzen bis gelöst, verdünnen auf 200 ml mit Äthanol; Spray [150].

(c) 150 mg DNPH in 25 ml Wasser + 22 ml conc. HCl, verdünnen mit Wasser auf 100 ml [231].

(d) 1 g DNPH in 1 l Äthanol + 10 ml HCl [230].

Das DNPH-Reagens kann mit Tollens-Reagens auf ein und demselben Chromatogramm kombiniert werden [150]. Die Reihe der Empfindlichkeit ist: Δ^4 -3-Ketone (2–5 γ /cm²; orange) > 3-Ketone (gelb) > 20-Ketone > 17-Ketone > $\Delta^{1,4}$ -3-Ketone; α -Ketole geben sehr schlecht an, 11-Ketone überhaupt nicht [150, 232].

(4) *Silberdiammin* (Tollens Reagens) für reduzierende Steroide [190, 191, 233], Glykoside und Aglykone [234], auch α -Bromketone [150].

Eintauchen in eine frische Lösung von 10 ml 0.1 N-AgNO₃ + 10 Tropfen conc. NH₄OH + 5 ml 10% NaOH; nach maximaler Farbentwicklung spülen in einer 5% igen Lösung von Na₂S₂O₃ und in Wasser [191].

(5) *Tetrazoliumsalze* für reduzierende Steroide (α -Ketole).

(a) Triphenyltetrazoliumchlorid [233]: 2 Vol. 0.2% in Wasser + 1 Vol. 10% NaOH kurz vor Gebrauch mischen; spritzen oder besser eintauchen (rote Flecken).

(b) Blautetrazolium (BT) [139, 233]: Durchziehen der Chromatogramme durch eine frische Mischung von 1 Vol. 0.1% BT + 9 Vol. 2 N-NaOH (1–2 Tage haltbar) und Auflegen auf eine Glasplatte. Es lassen sich noch bis zu 0.2 γ Steroid mit α -Ketol-Seitenkette/cm² nachweisen (sofort blaue Flecken). Auch Ring- α -Ketole geben an, gelegentlich sogar Δ^4 -3-Ketone oder Glykol-Seitenketten, wenn auch nur sehr schwach und langsam. Andere Reagens-Mischungen vgl. [235]. Die BT-Reaktion lässt sich ausgezeichnet mit der NaOH-Fluoreszenz-Reaktion kombinieren (s. diese).

(6) *Arsenmolybdat* [236] für Steroide mit α -Ketol- oder Δ^4 -3-Ketogruppen (blaue Flecken). 25 g Ammonmolybdat in 450 ml Wasser + 21 ml conc. H₂SO₄ + Lösung von 3 g Na₂HAsO₄, 7 H₂O in 25 ml Wasser. 48 Stunden auf 37° erwärmen und filtrieren. Umständliche Applikation (vgl. [236]).

(7) *Natronlauge-Fluoreszenz* für Δ^4 -3-Ketosteroide [177], am besten mit wässriger NaOH in Kombination mit Blautetrazolium [139, 237], wie dort beschrieben. Nach Antrocknen der benetzten Chromatogramme auf der Glasplatte bei Raumtemperatur für 30–45 Minuten werden sie bei 90° im Ofen getrocknet (15–20 Minuten, leichter Durchzug, oder durch Infrarot-Strahlung). Die Bedingungen zur Erzielung einer optimalen Fluoreszenz sind empirisch zu ermitteln. Die Reaktion ist ziemlich spezifisch für Δ^4 -3-Ketosteroide (sattgelbe Fluoreszenz unter UV-Licht von ca. 360 m μ) und sehr empfindlich (Grenze ca. 0.1 γ /cm²). Progesteron und einige verwandte Steroide sowie 19-Nor-Steroide und 2 α -Hydroxy-Steroide [238] reagieren schwächer und mehrfach konjugierte Δ^4 -3-Ketone gar nicht. Auch 7-Hydroxy- Δ^4 -3-Ketone reagieren nicht wegen der leichten Bildung von 3-Keto-4,6-dienen. Eine mehr oder

weniger starke Verschiebung nach grün oder blaugrün tritt mit 19-Hydroxy- Δ^4 -3-Ketonen auf [68]. Δ^1 -3-Ketone und α,β -ungesättigte Ketone in anderer als 3-Stellung scheinen nicht zu reagieren [181]. Eine Ausnahme bilden die gesättigten 3,6-Diketone, die eine gelbe Fluoreszenz geben, vermutlich durch Enolisierung zu Δ^1 -3-Keto-6-hydroxy-Verbindungen.

(8) *Isonicotinsäurehydrazid (INH)* ist neuerdings als Reagens für Δ^4 -3-Keto-Steroide vorgeschlagen worden [239]. Nach dem Spray mit einer Lösung von 25 mg INH in 50 ml saurem Alkohol (0.625 ml conc. HCl ad 1000 ml mit dest. Äthanol) lässt man 1 Stunde bei Raumtemperatur trocknen.

(9) *Phosphorsäure* für verschiedene Klassen besonders hydroxylgruppenhaltiger Steroide (u.a. Corticosteroide [213, 218]), Herzglykoside, Aglykone [215, 240] und Gallensäuren [240]. Man erhält lebhafte Fluoreszenzfarben wechselnder Intensität im UV-Licht (ca. 360 m μ ; z.B. Cortisol grün bis zu 1 γ /cm²). Meistens wird zum Eintauchen eine 20%ige wässrige Lösung verwendet [213, 218], für den Spray auch eine alkoholische [241]. Reste von Propylenglykol auf dem Chromatogramm verstärken die Farbtensitäten, solche von Formamid schwächen stark ab. Qualitativ ähnliche Fluoreszenzfarben erhält man auch mit 20%iger *p*-Toluolsulfonsäure in Äthanol [218].

(10) *Trichloressigsäure* für Pregnantrirole [242], Herzglykoside und Aglykone (z.B. [228, 243, 244, 245, 246]), Sapogenine [247] und andere. Meistens als Spray verwendet:

(a) 25% in Äthanol [228, 242] oder 20–25% in Chloroform [245, 248] und 5 Minuten auf 100° erhitzen.

(b) 33% in Chloroform + 1 Tropfen H₂O₂ pro 10 ml Reagens [244].

(c) 2 Vol. 25%ige Lösung in Äthanol + 8 Vol. 3% Chloramin in Wasser, 10 Minuten 120° [228]. Man erhält meist verschiedenerlei Fluoreszenzfarben im UV-Licht (360 m μ).

(11) *Phosphomolybdänsäure* für diverse Steroide (blaue Flecken [195, 249]), Steroidsulfate und -Glukuronide [250], Oestrogene [200], Gallensäuren [251, 252], Steroidalkaloide. 2–10% in Alkohol, bei 80–100° [249, 250], oder 10% in Aceton [253]. Unterschiedliche Empfindlichkeit (1–50 γ /cm²).

(12) *Kieselwolframsäure* für diverse Steroide [249] aber mit meist geringer Empfindlichkeit. 25% in Äthanol, Spray, Trocknen 2–5 Minuten bei 110°; verschiedene Farben.

(13) *Phosphowolframsäure* für Sterine [195, 197]: 10–15% in Äthanol.

(14) *Phenol-Molybdän-Perchlorsäure* für Δ^5 -3-Hydroxy-Steroide [254]: Spray mit wassergesättigtem Phenol, Trocknen bei 20–75°; Spray mit 1 g Ammonmolybdat + 2.5 ml 60%ige Perchlorsäure in 100 ml 0.1 N-HCl und Erhitzen auf 75–80° für 3–8 Minuten. Rosa Farbe für Δ^5 -3 β -Hydroxy-Steroide; Empfindlichkeit bis ca. 2 γ /cm² (unchromatographiert).

(15) *Antimontrichlorid* für Steroide aus allen Gruppen, insbesondere Δ^5 -3-
Literatur S. 252/258.

Hydroxy-Steroide [213], Sterine [193], Oestrogene [255], progesteronähnliche Steroide [256], Cardenolide [228, 248, 257, 258], Bufogenine [96], Sapogenine [259, 260], Gallensäuren [261], und diverse andere [214, 262, 263].

(a) gesättigte Lösung in Chloroform [213], eintauchen und 1–5 Minuten trocknen bei 80–90°.

(b) 25 g Antimontrichlorid in 5 ml Nitrobenzol [262], Spray und Erhitzen auf 90°.

(c) 20% in Methylenchlorid + 2% Acetylchlorid [263].

(d) Vorbehandlung der Chromatogramme in Chlorgas 20 Minuten lang, dann Spray mit einer Mischung von 38 g Antimontrichlorid und 10 ml Acetanhydrid (frisch bereiten), Erhitzen auf 90–100°; in vielen Fällen intensivere Farben oder Fluoreszenzen als ohne Chlorbehandlung [214].

(e) Gesättigte Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform + 10–20% Thionylchlorid. Spray, 3–5 Minuten 95° [198]; diese Variante soll ebenfalls intensivere Farbreaktionen liefern.

Antimontrichlorid-Reagenzien sind besonders dann vorteilhaft, wenn es sich um Verbindungen handelt, die mit den unter 1–10 angeführten Indikatoren nicht oder schlecht reagieren. Man erhält meistens im UV (360 m μ -Region) fluoreszierende Farben ganz unterschiedlicher Intensität (Feuchtigkeit schadet!).

(16) *Antimonpentachlorid* für diverse Steroidklassen wie Sterine [205, 264, 265], Oestrogene [199, 200, 266], Steroidamine [194] und andere [231, 249]: 5–50%ige Lösung in Chloroform, Eintauchen oder Spray, ev. mit nachfolgendem kurzen Erhitzen (empfindlich gegen Feuchtigkeit).

(17) *Zinkchlorid* für diverse Steroide:

(a) 30% in abs. Methanol, Spray und Erhitzen bei 130° bis zu einer Stunde [325].

(b) Spray mit einer Lösung von 20 g wasserfreiem Zinkchlorid in 30 ml Eisessig, auf 90° erhitzen. Die hierbei erhaltenen Farben oder Fluoreszenzen können teilweise bedeutend verstärkt werden durch Nachbehandlung mit einer Lösung von Benzoylchlorid–Chloroform (1:1) und Trocknen [267]; siehe auch [266].

(18) *Zinntetrachlorid* [139]: 30% in Chloroform, Eintauchen, Trocknen 20 Minuten 90°. Gibt für gewisse Steroide gute Fluoreszenzen im UV-Licht.

(19) *Jod–Kaliumjodid* gibt mit Cortison und einigen wenigen anderen Steroidverbindungen Blaufärbung [233, 266, 268]: 0.3% Jod in 5%iger wässriger Kaliumjodidlösung. Eine Nachbehandlung der besprühten Chromatogramme in Äther soll die Reaktion viel empfindlicher machen, insbesondere für oxygenierte Progesteron-Derivate [269].

(20) *Jod* [270] in Form von Dampf oder als Lösung in Petroläther gibt auch mit verschiedenen Steroiden flüchtige gelbe bis braune Flecken meist mässiger Intensität [177, 249, 271], Gallensäuren [240]. Dieses Reagens lässt sich auch in Kombination mit Perjodsäure für Steroide benützen [231].

(21) *Ferrichlorid* bzw. *Ferrichlorid–Kaliumferricyanid* für Oestrogene bzw. Enole

(blaue Flecken): 2% Ferrichlorid in abs. Methanol [266] oder viel besser eine frische Mischung aus gleichen Teilen 1% wässrig Ferrichlorid und 1% wässrig Kaliumferri-cyanid [272].

(22) *Aromatische Aldehyde + Säuren* für diverse Steroide, insbesondere Glykoside und Aglykone wie z.B.:

(a) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Eisessig [213, 260, 273], weitere Literatur in [225].

(b) Dimethylaminobenzaldehyd-Schwefelsäure-Acetanhydrid [260, 271].

(c) Zimtaldehyd-Schwefelsäure-Acetanhydrid-Antimontrichlorid [275] für Saponine.

(d) Furfurol-Eisessig oder Phosphorsäure [225, 276].

(e) Vanillin-Phosphorsäure [274, 276, 277] für 17-Hydroxy-20-keto-20-methyl-steroide und andere.

(f) *p*-Hydroxybenzaldehyd-Äthanol-Schwefelsäure für Sapogenine [382, 383].

(23) *3,5-Dinitrobenzoesäure* (Kedde-Reagens) für Cardenolide (blauviolette Flecken): Spray mit 1% in 0.5 *N*-KOH in Methanol-Wasser 1:1 [208] oder mit einer Mischung gleicher Vol. von 2%iger Lösung in Methanol + 2 *N*-KOH [248].

(24) *Kaliumjodwismuthat* (Kraut-Drageendorff-Reagens) und *Kaliumjodplatinat* für Girard-Derivate [190] und Steroid-Alkaloide [194, 278, 279].

(25) Sollten die genannten Reagenzien keinen Nachweis der zu analysierenden Steroide auf dem Chromatogramm erlauben, so gibt es noch weitere Möglichkeiten über welche folgende Zusammenstellung orientiert:

<i>Reagens</i>	<i>Nachweis für</i>
Salicyloylhydrazid (+Indoanilintest [381]) conc. od. 90%ige H ₂ SO ₄ [122, 268, 280]	Steroide mit reaktiven Oxogruppen
Schwefelsäure-Eisessig [213, 263]	diverse Steroide
15%ige rauchende Schwefelsäure [266]	diverse Steroide
Phenylsulfonsäure-Phosphorsäure [266]	Oestrogene
Osmiumtetroxyd [281]	Oestrogene
Silbernitrat, Belichten und Entwickeln [198]	α, β -ungesättigte Ketone
Phthalsäure-Zinkchlorid [282]	5,6-Dibromide
<i>p</i> -Phenylendiamin-phthalat [302]	Oestrogene
Millons Reagens [266]	Δ^4 -3-Ketosteroide
Bromwasser [266]	Oestrogene
Nitrose Gase-Ammoniak [284]	Oestrogene
Folin-Ciocalteu-Reagens [190, 285]	Oestrogene
Diazo-Reagens (Pauly) [255, 294]	Oestrogene, reduzierende Steroide
Nitroprussid-Natrium (Legal-Reagens) [228, 267, 273]	phenol. Steroide, Oestrogene
Pikrinsäure (Baljet-Reagens) [228, 249]	Cardenolide
<i>p</i> -Nitranilin [276]	Cardenolide
Jodat-Benzidin [283]	Glykoside
Permanganat [233]	div. Steroide
Permanganat-Perjodat [286]	div. Steroide, Saponine
Fluorescein (0.0005%, Kontrastverfahren) [271]	div. Steroide
Eriochromcyanin [198]	stark lipophile Sterine
Mayers Reagens (HgCl ₂ , KJ, ZnCl ₂) [278]	Steroid-alkaloide
Fröhdes Reagens (Mo-H ₂ SO ₄) [278]	Steroid-alkaloide
Blut (biolog. Auswertung) [247]	Sapogenine

In analoger Weise wie die Photokopien von im UV-absorbierenden Substanzen lassen sich auch von den im UV-fluoreszierenden Flecken unter Verwendung von geeigneten Filtern Photokopien oder Photographien herstellen [287, 288].

(26) *Radioautogramm*. Radioaktive Steroide oder Steroid-Derivate lassen sich auf dem Chromatogramm direkt mit dem Zählrohr feststellen [155, 289] oder durch Kontakt mit X-Film während 1 Tag bis mehreren Wochen sichtbar machen [290, 291, 292, 293].

Im einfachsten Fall liefert die Auswertung eines Papierchromatogramms 2 verschiedene Daten, die gemeinsam bereits eine beschränkte Charakterisierung oder vorläufige Identifizierung erlauben:

$$1. R_F\text{-Wert} \left(\frac{\text{Distanz Start} - \text{Mittelpunkt des Fleckes}}{\text{Distanz Start} - \text{Lösungsmittelfront}} \right)$$

2. Farbreaktion oder physikalische Eigenschaft.

Verschiedene Faktoren beeinträchtigen aber den Wert dieser Daten, besonders wenn man die grosse Anzahl ähnlicher Steroide berücksichtigt.

Zu 1: Trotz grosser Sorgfalt in der Durchführung der Chromatographie und möglicher Konstanzhaltung der Bedingungen (wie Temperatur, Sättigung, Phasenmenge, Dauer) sind die R_F -Werte gewissen Schwankungen unterworfen. Es ist daher vorzuziehen, die Wandergeschwindigkeit einer unbekannt Substanz statt auf die Lösungsmittelfront F auf eine etwa ähnliche laufende Standardsubstanz S zu beziehen.

Der so erhältliche Wert $R_S = \frac{\text{Distanz Start} - \text{Mittelpunkt des Fleckes}}{\text{Distanz Start} - \text{Substanz } S}$ weist eine viel

bessere Konstanz auf mit Ausnahme von Fällen von Verdrängungseffekten und von sehr nahe beieinander laufenden Substanzen mit sehr kleinem oder sehr grossem R_S -Wert. Ausserdem lässt sich der R_S -Wert auch dann angeben, wenn die Lösungsmittelfront das Papier längst verlassen hat, was oft zur besseren Auftrennung nötig ist. Als S wird man am besten eine Substanz wählen (Steroid, Farbstoff, etc.) die unter den gegebenen Bedingungen in den mittleren Teil des Chromatogramms wandert (vgl. z.B. [150, 295]). Für eine gute chromatographische Charakterisierung ist darauf zu achten, dass die zu analysierenden Substanzen weder zu nahe dem Start noch der Lösungsmittelfront laufen. Im ersten Fall hat man länger zu chromatographieren oder ein polareres Lösungsmittel zu wählen, im letzteren ein schwächer polares. Auch unter diesen Bedingungen und unter Berücksichtigung einer Fleckenlänge von 1.5–3 cm hat man über längere Perioden mit einer gewissen Streuung der R_S -Werte zu rechnen. Handelt es sich um die papierchromatographische Charakterisierung oder Identifizierung einzelner Verbindungen oder besonders mehrerer Komponenten eines Gemisches, so wird man stets entsprechende Vergleichssubstanzen parallel mitchromatographieren lassen. Wesentlich sicherere Resultate erhält man ausserdem durch Verwendung verschiedener Lösungsmittelsysteme. Es sei an dieser Stelle noch an einige Faktoren erinnert, die die Wandergeschwindigkeit beeinflussen können, wie ungleichmässige Imprägnierung, unvollständige Sättigung der Gefässe, grössere Temperatur-

schwankungen, Höhe der Trogfüllung, Art des Einhängens der Papiere in den Trog (Saugwirkung), Dauer der Chromatographie. Bei genauen Vergleichschromatogrammen sollte man die äusserste Randzone von Blättern oder die beiden äussersten Streifen einer Serie leer lassen, da die mobile Phase gewisser Systeme in diesem Gebiet manchmal etwas hinter der Lösungsmittelfront auf dem Hauptteil zurückbleibt.

Zu 2: Qualität und Intensität vieler Farbreaktionen auf dem Chromatogramm sind ebenfalls gewissen Schwankungen unterworfen: Konzentration der Substanzen, Verunreinigungen oder Überlagerungen (Mischfarben), Ausführung der Farbreaktion (z.B. Stärke des Sprays, Erhitzungsdauer, Feuchtigkeit, Verunreinigungen in der Luft), Rückstände von Lösungsmittelsystemen (z.B. Formamid). Dies gilt besonders

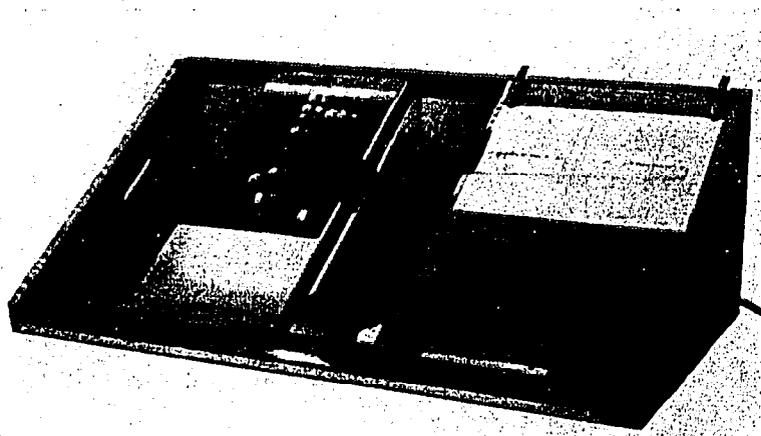


Fig. 12. Pantograph zur Auswertung von Photokopien und Chromatogrammen.

für die im UV-Licht Fluoreszenzen hervorrufenden Farbreaktionen. Man soll es sich auch hier zur Regel machen, wenn immer möglich mehr als nur eine Farbreaktion zur Charakterisierung heranzuziehen (Parallelchromatogramme).

Durch die Kombination von zwei oder mehr R_F - oder R_S -Werten und Farbreaktionen lassen sich die meisten Steroide ausgezeichnet charakterisieren und bis zu einem hohen Grad von Wahrscheinlichkeit mit Vergleichssubstanzen identifizieren (vgl. hierzu [150, 295]). Bei der grossen Anzahl isomerer Steroide soll jedoch nie die Möglichkeit ausser acht gelassen werden, dass sich gelegentlich zwei verschiedene Verbindungen papierchromatographisch nicht unterscheiden lassen, weshalb auch die Ausführung sogenannter Mischchromatogramme in Analogie zum Mischschmelzpunkt von geringerer Bedeutung ist. Für die Herstellung permanenter Belege erweist sich die Übertragung und Zuordnung der R_F - oder R_S -Werte und Farbreaktionen sowie eventuell UV-Absorption auf geeignete Formulare als recht nützlich, wozu R_F -Meter oder Pantograph (Fig. 12 [218]) dienen können.

(f) *Zusätzliche Methoden zur Identifizierung im Zusammenhang mit der Chromatographie*

(1) *Chromatographie von Derivaten.* Als sehr nützlich erweist sich die vergleichende Chromatographie von freien Steroiden und ihren Acetaten [178, 280], bzw. ihren
Literatur S. 252/258.

Oxydationsprodukten nach Behandlung mit Chromsäure [178, 180, 280, 293] oder Perjodsäure [296] in mikrochemischem Masstab, gegebenenfalls unter Benützung der Isotopenverdünnungstechnik [293]. Aus den Unterschieden in den R_F -Werten von freiem und umgesetztem Steroid (nötige Mengen 0.01–100 γ) bzw. aus dem Befund, ob überhaupt eine Reaktion stattgefunden hat, lassen sich oft wertvolle Schlüsse auf Anzahl und Stellung von Hydroxylgruppen (primär, sekundär, tertiär; vgl. auch Abschnitt IV 3) ziehen. Schwer trennbare, gesättigte und unkonjugiert ungesättigte 17-Ketosteroide lassen sich durch Behandlung mit Perbenzoesäure differenzieren, indem die letzteren in höher polare Derivate übergeführt werden und die ersteren unverändert bleiben [211]. Eine zusätzliche Identifizierung von 17-Ketosteroiden ist durch Chromatographie ihrer Zimmermann-Farbkomplexe vorgeschlagen worden [297].

(2) *Mikrochemische Reaktionen auf dem Chromatogramm.* Unter bestimmten Bedingungen lassen sich Steroide auf dem Chromatogramm selbst oxydieren, reduzieren oder hydrolysieren, worauf die Reaktionsprodukte mit Farbreaktionen oder spektrographisch nachgewiesen werden. Durch abwechselnde Oxydation, Reduktion und Farbreaktion lässt sich die Natur der Seitenkette bei C_{21} -Steroiden einigermaßen charakterisieren [298], jedoch sind Nebenreaktionen zu berücksichtigen. Alkalische Perjodsäureoxydation und folgende positive DNB-Reaktion scheint spezifisch für eine Glycerinseitenkette zu sein [299], während bei saurer Perjodsäureoxydation alle 17,20-Diole reagieren [300]. Eine Unterscheidung zwischen Dihydroxyaceton- und α -Ketolseitenkette soll durch die erhöhte Empfindlichkeit der ersteren gegenüber Alkalibehandlung vor dem Reduktionstest (auf dem Chromatogramm) möglich sein [301]. Ketale von Δ^4 -3-Ketosteroiden lassen sich auf dem Papier durch Besprühen mit 50%iger wässriger Glykolsäure und 20 Minuten Erhitzen bei 90° im Trockenschrank glatt spalten, worauf die gebildeten Δ^4 -3-Ketone wie üblich durch UV-Photokopie nachgewiesen werden können [81].

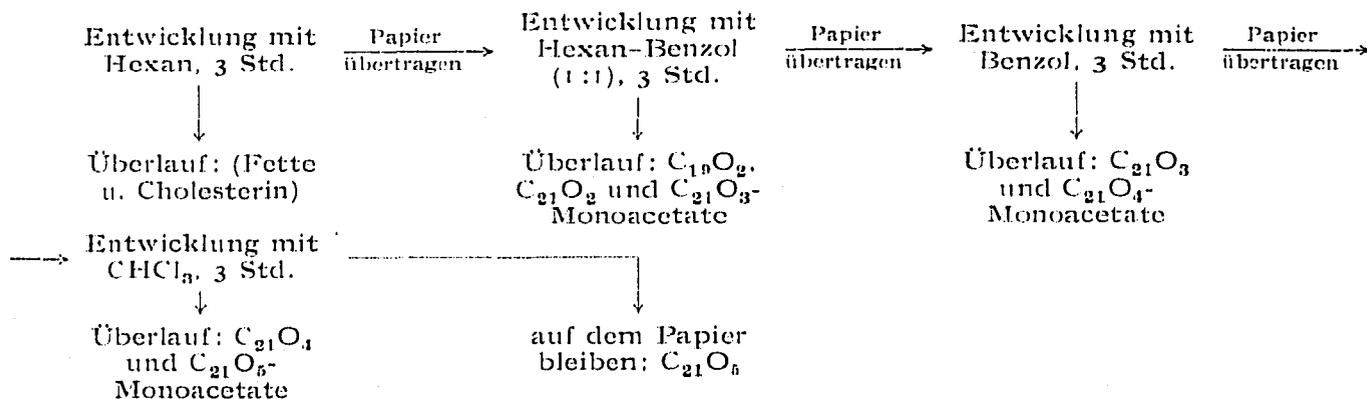
(3) *Spektrophotometrische Charakterisierung der Eluate.* Neben der UV-Absorption der Eluate in Alkohol (vgl. [311]) liefert diejenige in alkalischem Äthanol [303], in conc. Schwefelsäure für Steroide [178, 343, 344], Östrogene [179] oder Sapogenine [306, 307], in Phosphorsäure-Schwefelsäure [308] oder in "100%iger Phosphorsäure" [309, 310] zusätzliche Möglichkeiten für die Charakterisierung. Von den *in vitro* durchführbaren Farbreaktionen seien diejenigen mit Blautetrazolium [312, 313], Kalium-*tert.*-butylat ("soda fluorescence") [314, 315], Perchlorsäure [316], Jodtrichlorid [317] und besonders Phenylhydrazin nach PORTER-SILBER (Dihydroxyaceton-Seitenkette [318]) erwähnt. Auch die Perjodsäureoxydation lässt sich zur Charakterisierung der Seitenkette durch Abspaltung z.B. von Formaldehyd im Mikromasstab heranziehen [319] ebenso wie zur Charakterisierung des restlichen Moleküls (z.B. Bildung von 17-Ketonen, von Säuren oder eines 5-Ring-Lactones aus Aldosteron).

(g) *Allgemeine Trennungsschemata*

Für viele Zwecke wird es genügen, Chromatogramme in einem System oder parallel in mehreren Systemen auszuführen. Bei sehr komplizierten Mischungen wie z.B.

Harn- oder Organextrakten gelingt eine völlige Auftrennung nur durch wiederholte Chromatographie, fraktionierte Elution und Rechromatographie in anderen Systemen. Man verfährt z.B. nach folgendem Schema [178]:

Steroid-Gemisch auf mit Formamid imprägniertem Papier aufgetragen



oder auf ähnliche Weise [320, 321, 322]:

Neutralextrakt

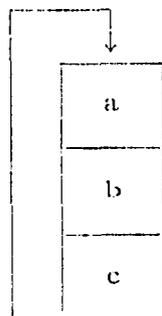
System A



x Stunden

Eluat

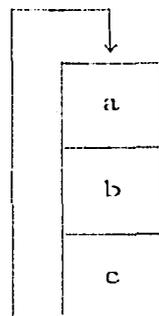
System B



y Stunden

Eluat

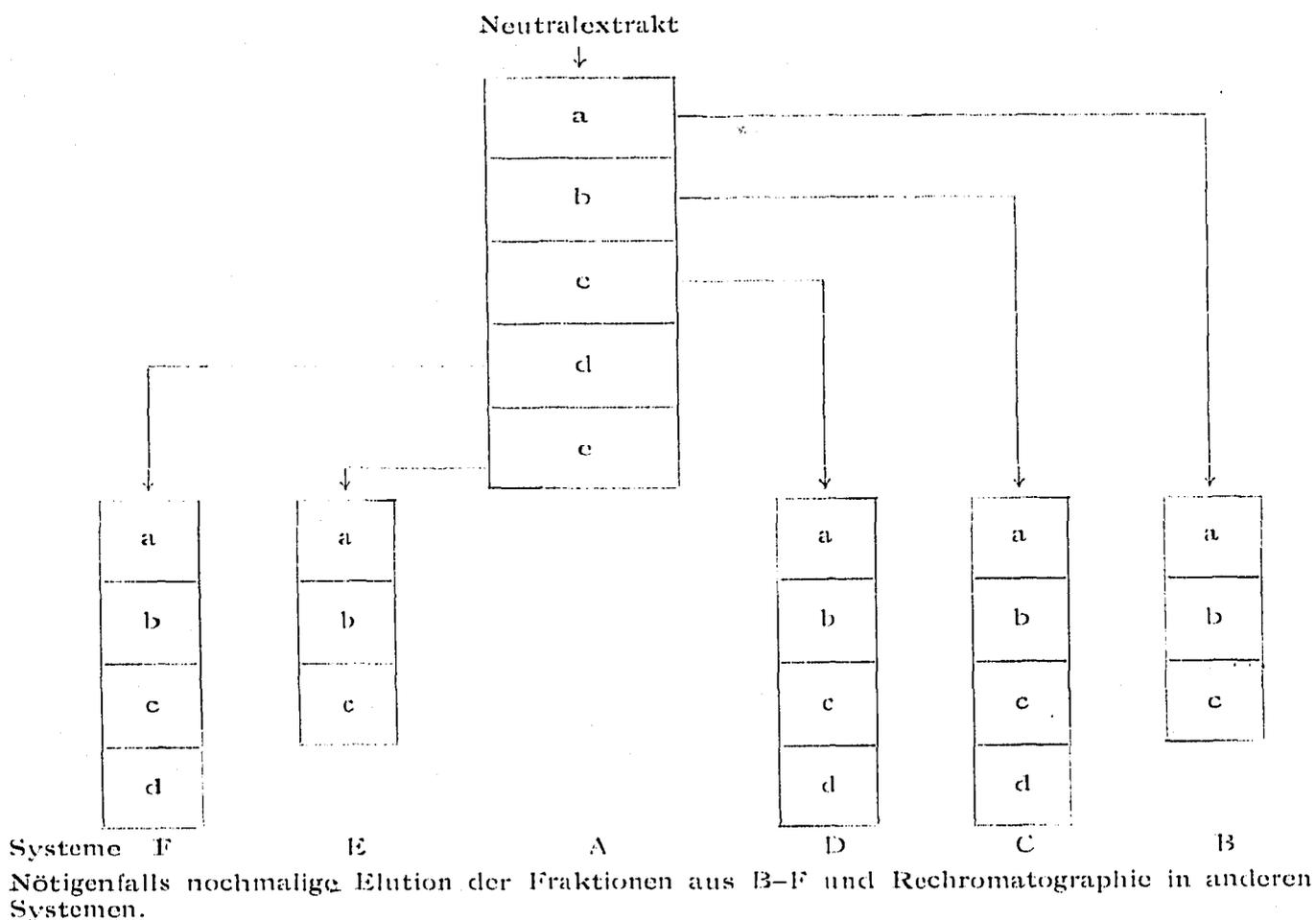
System C



Lösungsmittelfront

Wir ziehen im allgemeinen die auf S. 227 dargestellte Fraktionierung vor (vgl. z.B. [323]) unter Anpassung der Polarität der verschiedenen Lösungsmittelsysteme an die Polarität der Eluate aus dem 1. Chromatogramm.

In diesem Zusammenhang ist noch kurz auf die Möglichkeiten der *Elution* von Steroiden aus den Chromatogrammen hinzuweisen. Bei direkter Elution z.B. aus quer zur Chromatographie-Richtung geschnittenen Banden oder Streifen verwendet man am besten 80-100%iges Methanol oder Äthanol für höher polare Steroide, während für schwach polare Chloroform oder Methylenchlorid genügt. Es ist zu berücksichtigen, dass sich die auf der Cellulose adsorbierten Steroide in den üblichen Lösungsmitteln viel schlechter lösen als *in vitro*. Entweder überschichtet man die Papierstückchen mit dem Lösungsmittel, dekantiert und wiederholt die Prozedur [178] oder man bedient sich je nach Bedarf einer der beschriebenen speziellen Elutionsvorrichtungen [46, 149, 179, 210, 304, 305], die sich auch sehr gut für quantitative Bestimmungen eignen. Bei grösseren Mengen von Papier bewährt sich folgendes Verfahren [210]: Das



Papier wird mit 20%igem wässrigem Methanol oder Tetrahydrofuran zu einem dicken Brei zerstossen oder zerschlagen, nach einiger Zeit scharf abgenutzt und langsam mit reinem Methanol oder Tetrahydrofuran nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und mit einem organischen Lösungsmittel zurückextrahiert.

(h) Präparative Papierchromatographie

In letzter Zeit ist die Papierchromatographie immer mehr auch in präparativem Masstab bis zu Mengen von einigen Gramm angewendet worden. Sie hat den Vorteil, dass sie sehr rasch arbeitet und nur relativ wenige, aber gut definierte Fraktionen liefert. Entweder chromatographiert man auf einer grösseren Anzahl loser Blätter [46] (z.B. im platzsparenden Schlitztrog [218]; über die Beladung vgl. Abschnitt IV 1 c) oder, wenn es sich um gewöhnliche wässrige Systeme oder solche vom ZAFFARONI-Typ handelt auf zusammengepressten Papieren. So ist z.B. die präparative Trennung von Herzglykosiden mit Erfolg auf dem Chromatopile ausgeführt worden [326]. Als besonders brauchbar hat sich für die Auftrennung komplizierter Steroidgemische verschiedener Herkunft der Chromatoblock [218] erwiesen (vgl. Fig. 13) unter Verwendung von ZAFFARONI-Systemen für Mengen bis zu 1.5 g pro Block (= Blatt). Das Chromatogramm ist bei richtiger Ausführung durch den ganzen Block hindurch bemerkenswert gleichmässig. Nach dem Trocknen der Blätter lassen sich die einzelnen,

scharf getrennten Fraktionen (Zonen) z.B. durch UV-Photokopie oder einfacher mit dem Fluoreszenzschirm (Fig. 11 [218]) erfassen, anzeichnen, ausschneiden und eluieren. In Fig. 10 ist eine UV-Photokopie eines Blattes aus einem solchen Chromato-

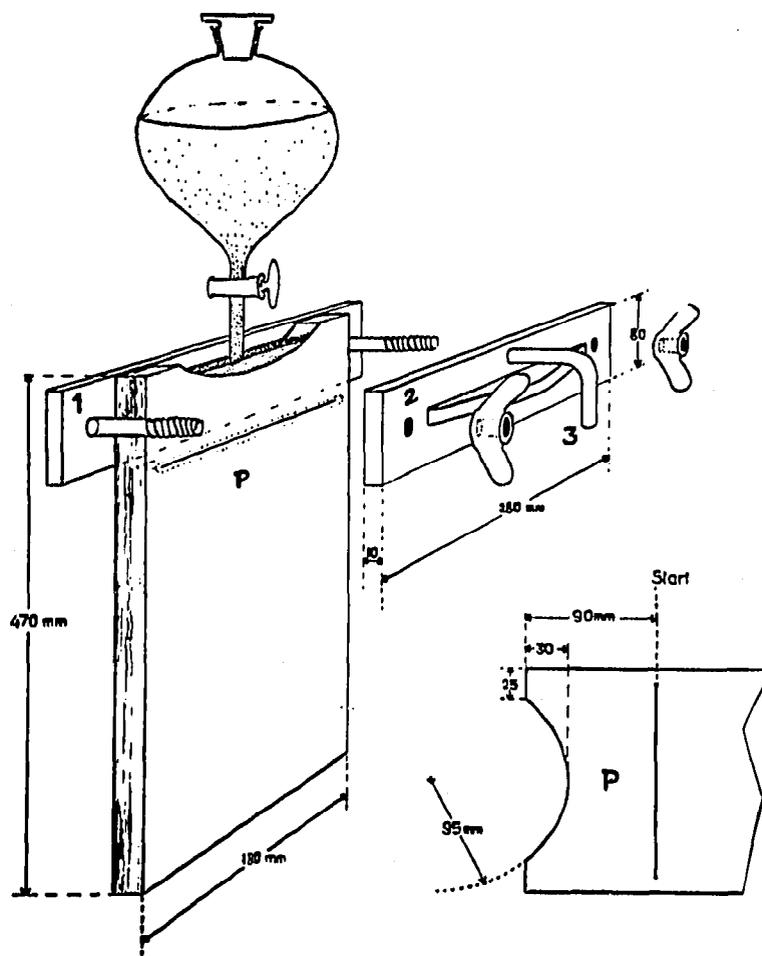


Fig. 13. Chromatoblock für die präparative Papierchromatographie.

block (Formamid/Benzol-Chloroform 1:1) wiedergegeben, wobei jedes Blatt mit 10 mg einer Nebennierenfraktion beladen wurde. Die Auftrennung ist bei der gegebenen Beladung mindestens ebenso gut wie im analytischen Chromatogramm.

(i) Quantitative Methoden

Ist die quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen erwünscht, hat man in erster Linie den Fehler beim Auftropfen möglichst klein zu halten, mit parallel laufenden Standardkonzentrationen zu arbeiten und auf die Verwendung reiner Papiere zu achten. Im einfachsten Fall gelingt eine semiquantitative Bestimmung bei Wahl optimaler Konzentrationen (je nach der Empfindlichkeit des Indikators) durch visuellen Vergleich der Flecken (Grösse und Intensität) unbekannter Konzentration mit denjenigen von Standardsubstanzen. Vor allem eignen sich hierzu UV-Absorption, Reduktionsteste (Blautetrazolium), Natronlauge-Fluoreszenz, Phosphorsäure etc. Bei einiger Routine ist die Fehlergrenze nicht grösser als $\pm 20\%$. Vgl. die Beispiele

Literatur S. 252/258.

für die Bestimmung von Aldosteron [210], Corticosteroiden [327] oder Pregnenderivaten [150]. Trotz der relativ grossen Fehlergrenze ist diese Methode oft vorteilhaft, wenn Gemische aufzutrennen sind, von welchen eine bestimmte Komponente in sehr geringer Konzentration zu bestimmen ist, und wenn sich diese Komponente nur mit einer Farbreaktion genau auf dem Chromatogramm lokalisieren lässt. Eine Bestimmung der Konzentration aus der Fleckengrösse allein scheint in gewissen Fällen möglich [328], dürfte aber allgemein kaum anwendbar sein. Eine objektive Auswertung lässt sich entweder auf dem Papier direkt durchführen oder nach Elution der bestimmten Zone oder des entwickelten Farbflecks *in vitro*. In geeigneten Adaptern zu Spektrophotometern misst man direkt auf dem Chromatogrammstreifen die UV-Absorption [329, 330, 331, 332] oder den blauen Farbstoff (600 m μ) nach Behandlung mit Blautetrazolium [333]. Farbflecken auf dem Chromatogramm, z.B. mit *m*-Dinitrobenzol für 17-Ketosteroide [227] oder Blautetrazolium für Corticosteroide [235] lassen sich auch mit dem Densitometer relativ gut ausmessen, nachdem das Papier transparent gemacht worden ist. Andere Vorrichtungen erlauben die Messung von UV-fluoreszierenden Flecken entweder direkt auf dem Papier (z.B. Natronlauge-Fluoreszenz von Corticosteroiden [237]) oder durch Densitometrie von Fluoreszenzphotographien, im Fall von Herzglykosiden [287] nach Behandlung mit Trichloressigsäure.

Genauere Resultate erhält man im allgemeinen, wenn man die auf den Chromatogrammen befindlichen Substanzen (Lokalisierung eventuell auf Parallelchromatogrammen) als solche eluiert und *in vitro* spektrophotometriert, sei es direkt oder nach Umsetzung mit einem Reagens, indem man gegen das Eluat eines substanzfreien Chromatogrammstückes als Blank misst (Achtung auf niedrige Blindwerte durch Verwendung gewaschener Papiere [212]). So benützt man häufig die Absorption bei 239–240 m μ für Δ^4 -3-Ketosteroide (Corticosteroide etc. [150, 178, 223, 280, 304, 305]), bei 510–525 m μ nach Formazanbildung mit Blautetrazolium (für Corticosteroide [178, 305]) oder bei 526 m μ nach Reaktion mit Xanthydrol (für Cardenolide [248]). Beliebige andere Reaktionen können zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden, wie ZIMMERMANN-Reaktion für 17-Ketosteroide [211], LIEBERMANN-BURCHARD für Cholesterin [196], conc. oder rauchende Schwefelsäure für diverse Steroide [321, 212], "Natronlauge-Fluoreszenz" für Δ^4 -3-Ketosteroide [315], Umsetzung mit Hydroxylamin und Ferrichlorid zur Acetylgruppenbestimmung [178] oder Umsetzung mit weiteren, bereits in Abschnitt IV 1 f erwähnten Reagenzien. Ferner besteht eine Möglichkeit darin, dass man die Farbreaktion auf dem Chromatogramm ausführt und den gebildeten Farbstoff nach Elution *in vitro* misst. So lassen sich Formazanflecken in Pyridin-Salzsäure oder besser mit Tetrahydrofuran [334, 335] oder Essigester-Methanol (7:3) [336] vom Papier eluieren (λ max 550–560 m μ), das blaue Reaktionsprodukt von reduzierenden Steroiden mit Arsenmolybdat bereits mit Wasser ([236]; λ max 650–660 m μ). Die letzteren Methoden haben den Vorteil, dass die zu bestimmende Substanz bzw. ihr farbiges Reaktionsprodukt sehr genau aus dem Chromatogramm geschnitten werden können, während die Farbstoffbildung auf dem Papier und die Farbstoffelution Fehlerquellen in sich bergen. Im umgekehrten Fall, wenn das

unbehandelte Steroid erst eluiert und dann *in vitro* umgesetzt wird, ist zwar die Farbstoffbildung besser kontrollierbar, aber die genaue Lokalisierung der zu eluierenden Substanz bietet einige Schwierigkeiten, ausser sie lässt sich mit Hilfe von UV-Absorption, Fluoreszenz oder Radioaktivität bewerkstelligen (Achtung vor Verlusten durch UV-Bestrahlung [220, 221]). Schliesslich ist noch auf die vielversprechende quantitative Auswertung von radioaktiven Steroiden oder Steroid-Derivaten auf dem Papier oder *in vitro* hinzuweisen, die bis zu sehr niederen Konzentrationen möglich ist und unter Umständen (Doppeltracertechnik) alle Verluste auszuschalten vermag [289, 290, 291, 292, 293].

2. Spezielle Methoden

Ein allgemeiner Überblick über die Eignung von 14 ausgewählten Systemen für verschiedene Steroidklassen ist bereits weiter oben in Fig. 4 gegeben worden, wobei jeweils nur solange chromatographiert wurde bis die Lösungsmittelfront das untere Papierende erreicht hat (2.5–3 Std.). Die im oberen Teil der Chromatogramme befindlichen Substanzen lassen sich beliebig nach unten verschieben durch eine entsprechende Verlängerung der Chromatographiezeit um das 2- oder x -fache (Durchlaufchromatogramme). Dies soll als Anhaltspunkt dienen für die Ermittlung der Chromatographiedauer für Substanzen, von welchen in einigen der folgenden Tabellen lediglich der R_S -Wert angegeben ist, wobei als S z.B. Corticosteron oder Cortisol gewählt ist. Je nach diesem R_S -Wert wird man also so lange chromatographieren bis S irgendwo zwischen dem oberen und unteren Viertel der Papierlänge wandert. Wie schon erwähnt, ist bei der grossen Anzahl von Verbindungen ähnlicher Polarität auch innerhalb jeder Klasse die Unterscheidung ausser nach R_F - oder R_S -Werten in verschiedenen Systemen auch durch verschiedene Indikatoren üblich, die sich auf bestimmte funktionelle Gruppen im Steroidmolekül beziehen wie UV-Absorption, (α, β -ungesättigte Ketone), Blautetrazolium-Natronlauge (reduzierende Seitenkette oder Ringketol und Δ^4 -3-Keton), ZIMMERMANN-Reaktion (vornehmlich 17-Ketone), Dinitrophenylhydrazin (reaktive Ketogruppen) etc. Dadurch können einerseits selbst gleich schnell laufende Verbindungen differenziert werden, andererseits gibt die kombinierte Auswertung gleichzeitig Hinweise auf die mögliche Konstitution unbekannter Flecken. Als Beispiel sei z.B. das Verhalten der neuerdings sehr aktuellen $\Delta^1, 4$ -3-Ketosteroide im Vergleich zu den Δ^4 -3-Ketosteroiden erwähnt. Beide lassen sich durch UV-Photokopie leicht nachweisen, die gelbe Natronlaugefluoreszenz fällt aber nur mit letzteren Verbindungen positiv aus. Die in den folgenden Abschnitten tabellarisch angeführten Steroide werden daher nicht nur nach R_F - oder R_S -Werten geordnet, sondern häufig auch in Untergruppen eingeteilt, z.B. mit den Merkmalen UV + BT +, UV + BT –, UV – BT +, UV – BT – oder UV-Absorption in Kombination mit DNB- oder DNPH-*Reaktion. Im übrigen wird darauf verzichtet,

* Die hier und in den Tabellen benützten Abkürzungen haben folgende Bedeutung: UV = UV-Absorption bei 240 $m\mu$; BT = Reduktionsvermögen mit Blautetrazolium; DNB = alkalisch *m*-Dinitrobenzol; DNPH = Dinitrophenylhydrazin; P = Propylglykolyk; F = Formamid; Tol = Toluol; Be = Benzol; Cy = Cyclohexan; A, B₁₋₅, BL₁, C und E₂B bezeichnen Systeme vom BUSH-Typ (Zusammensetzung siehe Fig. 4, S. 209); DH = Dihydro-; TH = Tetrahydro-.

sämtliche R_S - oder R_F -Werte und alle qualitativen und quantitativen Angaben über die Farbreaktionen aus der Literatur wiederzugeben, da die Bedingungen der Ausführung von Ort zu Ort erfahrungsgemäss recht verschieden sind, so dass zur eindeutigen Identifizierung doch stets Vergleichssubstanzen parallel mitchromatographiert werden müssen. Die folgenden Tabellen sollen in erster Linie anhand zahlreicher Vertreter aus allen Steroidklassen eine eingehende Orientierung über die Möglichkeiten gewähren; vgl. hierzu auch die Zusammenstellung in [150].

Alle Werte beziehen sich auf Raumtemperatur (meist 22° C) wenn nichts anderes angegeben ist und stellen Mittelwerte aus mehreren Läufen dar, wenigstens soweit es sich um eigene Angaben handelt.

(a) Sterine

Die ursprünglichen ZAFFARONI-Systeme sind für die meisten Sterine zu polar, hingegen erwies sich ein System mit Phenylcellosolve (Äthylenglykolmonophenyläther) als stationäre Phase und z.B. Heptan als mobile Phase mit Whatman No. 7 als allgemein anwendbar [267, 380]. R -Werte verschiedener Derivate sind in Tab. 30 wiedergegeben (aus [264]). Als Indikatoren dienen Antimontrichlorid und Antimonpentachlorid [205, 265]; ersteres gibt besonders mit Δ^5 -3 β -Hydroxy-Steroiden empfindliche Farbreaktionen [267]. Zur Chromatographie von ^{14}C -Cholesterin-Derivaten vgl. [291]. Für

TABELLE 30
STERINE IM SYSTEM PHENYLCELLOSOLVE/HEPTAN [264]

	R_S	SbCl_5 in CHCl_3 (20%)
Monohydroxy-Sterine	$S = \text{Cholesterin}$ 5-stündige Entwicklung	
C_{27} -Sterine		
Cholesterin	1.0	rosa
Lathosterin	0.9	rötl.-violett
7-Dehydrocholesterin (2 \mathcal{F})	0.7	blaugrün
Cholestanol	1.1	rosa-violett
Coprosterin	1.3	rosa
C_{28} -Sterine		
Brassicasterin (2 \mathcal{F})	1.0	rosa
Ergosterin (3 \mathcal{F})	0.6	blaugrün
C_{29} -Sterine		
β -Sitosterin	1.0	rosa
α -Spinasterin (2 \mathcal{F})	0.9	grau
Stigmasterin (2 \mathcal{F})	1.0	rosa
Di- und Tri-Hydroxy-Sterine	$S = \Delta^5$ -Cholestendiol(3 β ,7 β) 20-stündige Entwicklung	
Δ^5 -Cholestendiol(3 β ,7 β)	1.0	blaugrün
Δ^5 -Cholestendiol(3 β ,7 α)	0.7	blaugrün
Δ^5 -Cholestendiol(3 β ,24)	0.4	braun
Δ^5 -Cholestendiol(3 β ,25)	0.4	braun
Δ^4 -Cholestendiol(3 β ,6)	0.6	hellbraun
Cholestantriol(3 β ,5 α ,6 β)	0.5	gelbbraun

Nach dem Spray geben Δ^7 -Sterine und 7 α - bzw. 7 β -Hydroxyderivate sofort brillante Farben; andere erst nach kurzem Erhitzen auf 100°, die Stanole erst nach längerem Erhitzen.

Literatur S. 252/258.

Sterine ist andererseits häufig das Verfahren mit umgekehrten Phasen verwendet worden. Während sich die Hydrophobierung des Papiers mit Quilon [205] kaum durchsetzen konnte, erweist sich diejenige mit Paraffinöl als recht brauchbar, wenn Eisessig-Chloroform-Paraffinöl-Mischungen (65:25:10) als mobile Phase dienen ([196, 197]; aufsteigend, Whatman No. 3).

Die R_F -Werte betragen für

Cholesterin	0.62
Cholesterin-acetat	0.34
Cholesterin-capronat	0.16
Cholesterin-stearat u. -palmitat	0.02
Cholesterin-oleat	0.03

Diese Verbindungen wurden nach der Elution auch halbquantitativ bestimmt. Mit einem ähnlichen System ist Vitamin D und eine Reihe verwandter Verbindungen chromatographiert worden [193]: Hydrophobierung mit 5% Paraffinöl in Leichtpetrol; mobile Phase:

(a) Äthylcellosolve-*n*-Propanol-Methanol-Wasser (35:10:30:25)

(b) *n*-Propanol-Methanol-Wasser (15:82:3)

(c) 95%iges Methanol; aufsteigend, Whatman No. 2.

Indikator Antimontrichlorid. Zur Verwendung von mit Aluminium-Seife imprägniertem Papier vgl. [204] und zum Versuch einer zweidimensionalen Trennung [192], wobei für die 1. Dimension ein Kieselsäurepapier (Adsorption) und für die 2. Dimension hydrophobiertes Papier (Vaseline; Verteilung) verwendet wurde. Über neue Arbeiten in dieser Klasse s. [384, 387].

(b) C_{18} -Steroide (Oestrogene)

Oestrogene lassen sich ohne besondere Schwierigkeiten in den üblichen Steroidsystemen chromatographieren (vgl. Tab. 31, Systeme I, II, III), vgl. auch Tab. III in [150]. Für Oestriol wird besser ein stärker polares System verwendet als für Oestradiol und Oestron. Alle sind leicht nachweisbar, besonders mit Ferrichlorid-Kaliumferri-cyanid, Folin-Ciocalteu, ferner mit Antimonpentachlorid, Antimontrichlorid, Phosphorsäure, *m*-Dinitrobenzol für Oestron, Diazo-Reagens sowie andere (vgl. Nachweisreaktionen IV 1 e). Die Trennung einer ganzen Reihe von Oestrogenen ist mit den Lösungsmittelsystemen P/Methylcyclohexan, F/*o*-Dichlorbenzol, F/Cyclohexan und F/Methylenchlorid beschrieben worden [179, 266]. So liessen sich in einem oder mehreren Läufen unterscheiden: Oestriol, Oestradiol-(17 α) und -(17 β), Oestron, 6-Dehydro-oestron, 7-Ketooestron, Equilin, Equilenin, 17 α -Äthinyloestradiol etc. Hierfür werden verschiedene Farbreaktionen beschrieben und eine quantitative Bestimmungsmethode durch Spektrophotometrie der Eluate bei 280–282 m μ angegeben. In einem System Benzol-Methanol-Wasser (10:8:2) erhält man bei 24° die in Tab. 31 unter V angegebenen R_F -Werte [282]. Der Nachweis erfolgt mit Phthalsäure-Zinkchlorid (gelbgrüne Fluoreszenz). Für die Chromatographie in neutralen Systemen sind noch weitere Varianten angegeben worden [285, 337 und neuerdings 379, 388]. Eine Verschiebung zu kleineren R_F -Werten erfolgt, wenn man als stationäre Phase statt Wasser eine wässrige Lösung von Lithiumchlorid oder Calciumchlorid $\cdot 2 H_2O$ ver-

wendet (mobile Phase Toluol–Methanol [294, 338], Tab. 31, System VI. Bei den Oestrogenen bieten sich ausserdem weitere Variationen durch Verwendung alkalischer Phasen: Man equilibriert zuerst mit beiden Phasen (stationäre: 0.5 *N*-NH₄OH, mobile: Chloroform–Benzol–*N*-NH₄OH (1:9:1)) das Whatman Papier No. 1 und entwickelt dann absteigend 2–3 Stunden [255], *R_F*-Werte s. Tab. 31, System VII. Über andere alkalische Systeme vgl. [284, 339]. Auch das reversed phase Verfahren ist für Oestrogene, insbesondere ihre Ester oder Äther, herangezogen worden [199, 200]; das Papier wird mit 5% Silikon (Aquatex 4040) in Cyclohexan hydrophobiert und 1 Stunde bei 110° getrocknet. Von der Mischung Wasser–Methanol–Benzol–Petroläther (2:7:3:6) verwendet man die untere Schicht als mobile Phase und die obere als stationäre, mit welcher das Gefäss gesättigt und equilibriert wird; *R_F*-Werte vgl. Tab. 31, System VIII. Schliesslich können Oestrogene auch in Form von Azo-Derivaten in Lösungsmittelsystemen vom BUSH-Typ getrennt werden [238, 340]; dieses Verfahren dürfte allerdings im Vergleich zu den neueren im allgemeinen nicht mehr so aktuell sein.

TABELLE 31
PAPIERCHROMATOGRAPHIE VON OESTROGENEN

	System							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Oestriol	0.00	0.00	0.05	0.05	0.18	0.00	0.02	
Oestradiol(17β)	0.36	0.93	1.40	1.29	0.68	0.27	0.78	
Oestradiol(17α)						0.45		
Oestron	2.22	1.62	2.01	1.57	0.86	0.78	0.89	
Equilin						0.65		
17α-Äthinyloestradiol						0.52		
Oestradiol(17β)-diacetat								0.42
Oestradiol(17β)-dipropionat								0.20
Oestradiol(17β)-dibenzoat								0.68
Oestronacetat								0.72

I	= Propylenglykol/Toluol	} <i>R_S</i> -Werte (<i>S</i> = Corticosteron)
II	= Formamid/Benzol–CHCl ₃ (1:1)	
III	= Petroläther–Benzol–Methanol–Wasser (3:7:5:5) = BL ₁	
IV	= BL ₁ , 38° C	
V	= Benzol–Methanol–Wasser (10:8:2)	} <i>R_F</i> -Werte
VI	= Toluol–Methanol–LiCl oder CaCl ₂ ·2 H ₂ O in Wasser	
VII	= CHCl ₃ –Benzol– <i>N</i> -NH ₄ OH (1:9:1)	
VIII	= Silikonpapier, polare Phase von Wasser–Methanol–Benzol–Petroläther (2:7:3:6)	

(c) *C*₁₉-Steroide (17-Ketosteroide)

In Tab. 32–35 sind die *R_S*-Werte zahlreicher *C*₁₉-Steroide in verschiedenen Systemen wiedergegeben [36], vgl. auch Tab. III in [150]. Diese *C*₁₉-Steroide lassen sich zweckmässig in Gruppen verschiedener Nachweisbarkeit (alle nicht reduzierend!) einteilen, wie z.B. Δ⁴-3-Ketosteroide (UV-Absorption bei 240 mμ, Natronlaugefluoreszenz),

17-Ketosteroide (DNB), Steroide ohne reaktive Ketogruppen (Antimontrichlorid, Phosphorsäure, Phosphomolybdänsäure etc.). Letztere Gruppe ist meist am schwierigsten nachweisbar, besonders solche mit 11-Ketogruppen, während Triole mit Antimontrichlorid relativ gut reagieren. Eine sehr ausführliche Studie über die Papier-

TABELLE 32
 R_S -WERTE ($S = \text{CORTEXON}$) VON C_{19} -STEROIDEN, UV + [36]

	P/Tol	$F/Be-Cy$ (1:1)	B_3	A^{360}	DNB	NaOH- Fluoreszenz
Δ^4 -Androstenol(11 β)-dion(3,17)	0.60	0.32	0.32		+	+
Adrenosteron	1.07	0.89	0.75	0.45	+	+
Δ^4 -Androstendion(3,17)	1.18	1.71	1.49	1.86	+	(+)
Testosteron	0.64	1.04	0.79	1.17	0	+
Testosteron(17 α)	0.74	1.23	0.93	1.47	0	+
Testololacton	0.93	0.42	0.41	0.19	0	+
1-Dehydro-testololacton	0.67	0.21	0.16		0	0

TABELLE 33
 R_S -WERTE ($S = \text{CORTEXON}$) VON C_{19} -STEROIDEN (UV —, DNB +) [36]

	P/Tol	$F/Be-Cy$ (1:1)	B_3	A^{360}	F/Be	DNPH
Androstandiol(3 β ,11 β)-on(17)	0.14	0.20	0.08			(+)
Δ^5 -Androstenol(3 β)-dion(11,17)	0.50	0.45	0.32		0.76	(+)
Androstanol(3 β)-dion(11,17)	0.50	0.44	0.34		0.75	(+)
Testanol(3 α)-dion(11,17)	0.65	0.66	0.47	0.35		(+)
Testanol(3 β)-dion(11,17)	0.67	0.75	0.50		0.91	(+)
Androstanol(3 α)-dion(11,17)			0.59			(+)
Androstantrion(3,11,17)	1.22	1.31	1.12		1.14	+
Testantrion(3,11,17)	1.22	1.33	1.14	1.11	1.15	+
Dehydroepiandrosteron	0.84	1.51	0.84	1.94		(+)
Androsteron	1.01	1.79	1.35	3.12		(+)

TABELLE 34
 R_S -WERTE ($S = \text{CORTICOSTERON}$) VON C_{19} -STEROIDEN (DNB +) [36]

	P/Tol	F/Be	$F/Be-CHCl_3$ (1:1)	BL_1^{360}	DNPH
Δ^5 -Androstendiol(3 β ,11 β)-on(17)	0.60	1.50	1.16	1.06	(+)
Androstandiol(3 β ,11 β)-on(17)	0.68	0.66	0.98	1.20	(+)
Testandiol(3 α ,11 β)-on(17)	0.74			1.20	(+)
Testanol(3 α)-dion(11,17)	2.30	3.30	1.79		(+)
Δ^5 -Androstenol(3 β)-dion(11,17)	2.34	3.20	1.67	1.40	(+)
Androstanol(3 α)-dion(11,17)		3.20	1.68		(+)
Androstanol(3 β)-dion(11,17)	2.39	3.23	1.69	1.40	(+)
Δ^4 -Androstenol(11 β)-dion(3,17)	2.42		1.42	1.54 (22°)	+, UV +
Testanol(3 β)-dion(11,17)	3.06	3.80	1.80	1.48	(+)
Androstantrion(3,11,17)	5.57	4.78	1.92	1.67	+
Testantrion(3,11,17)	5.81	4.82	1.95	1.70	+

TABELLE 35

 R_S -WERTE ($S = \text{CORTICOSTERON}$) VON C_{19} -STEROIDEN (DNB —, UV —) [36]

	P^*Tol	F/Be	$F/Be-CHCl_3$ (1:1)	BL_1^{80}	DNPH
Δ^5 -Androstentriol(3 β , 11 β , 17 β)	0.06	0.29	0.31	0.36	0
Androstantriol(3 β , 11 β , 17 β)	0.05	0.28	0.34	0.42	0
Testantriol(3 α , 11 β , 17 β)	0.06	0.35	0.39	0.51	0
Testantriol(3 β , 11 β , 17 β)	0.11	0.50	0.47	tailing	0
Androstantriol(3 α , 11 β , 17 β)	0.12	0.60	0.50		0
Δ^5 -Androstendiol(3 β , 17 β)-on(11)	0.16	0.74	0.73	0.69	0
Androstandiol(3 β , 17 β)-on(11)	0.15		0.70		0
Testandiol(3 α , 17 β)-on(11)	0.21	1.00	0.86	0.71	0
Testandiol(3 β , 17 β)-on(11)	0.24	1.00	0.86	0.78	0
Androstandiol(3 α , 17 β)-on(11)	0.26	1.15	0.93		0
Androstandiol(11 β , 17 β)-on(3)	0.79	1.45	1.20	0.99	+
Testandiol(11 β , 17 β)-on(3)	0.80	1.54	1.16	1.18	+

chromatographie von C_{19} -Steroiden stammt von SAVARD [180, 232], der besonders Propylenglykol/Ligroin als Lösungsmittel bevorzugt (50% Propylenglykol in Methanol zur Imprägnierung von Whatman No. 1). Zur Bestimmung der "relativen Wander- geschwindigkeit" (R_T -Wert) der einzelnen Ketosteroide werden Androsteron und Androstandiol(3 α , 11 β)-on(17) als Testsubstanzen benützt, deren absolute Wander- geschwindigkeit etwa 1 cm/Std. bzw. 0.1 cm/Std. beträgt. Der R_T -Wert wird nach der

Formel $R_T = \frac{\text{cm Substanz } x}{\text{cm Testsubstanz}} \cdot K$ ($K = \text{cm Testsubstanz/Std.}$) errechnet. Die R_T -

Werte verschiedener Steroidgruppen lassen sich entsprechend Tab. 36 zusammen- fassen. Wegen der hohen R_T -Werte der Gruppe I in diesem System trennt man sie besser in einem schwächer polaren Lösungsmittelsystem. In Gruppe II lassen sich die gesättigten 3,17- oder 3,20-Diketone gut von den entsprechenden Δ^4 -ungesättigten unterscheiden. Isomere, die sich nur durch sterische Isomerie am C-Atom 5 unter- scheiden, sind kaum trennbar. Teilweise gilt dies auch für Gruppen III und IV (s. hierzu Abschnitt IV 3). Die Analyse komplexer Steroidgemische kann man sich aber unter Umständen erleichtern, wenn man vorher die 3 α - und 3 β -Hydroxysteroide mittels Digitonin trennt. Bei sehr ähnlich laufenden Ketosteroiden wurden Ver- drängungseffekte beobachtet. Im übrigen sei auf die Originalliteratur verwiesen.

TABELLE 36

 R_T -WERTE VERSCHIEDENER STEROIDGRUPPEN NACH [180]
SYSTEM PROPYLENGLYKOL/LIGROIN

Gruppe	Steroidgruppen	R_T -Werte
I	Monoketosteroide, Monohydroxysteroide	3.0
II	Diketosteroide	1.5-3.0
III	Monohydroxy-monoketosteroide	0.2-1.5
IV	Monohydroxy-diketosteroide, Triketosteroide	0.2-1.5
V	Dihydroxy-monoketosteroide, Monohydroxy-triketosteroide, Dihydroxy-diketosteroide	0.01-0.2

Entwickelt man die mit Propylenglykol imprägnierten Papierstreifen mit Benzol-Cyclohexan (1:1) statt Ligroin [230] so scheint dies für die Trennung epimerer 17-Ketosteroide von Vorteil zu sein (vgl. auch Tab. 33 und 34). Das gleiche Lösungsmittelsystem wird zur Trennung und quantitativen Bestimmung von 17-Ketosteroiden verwendet, indem man die Chromatogramme mit alkal. *m*-Dinitrobenzollösung optimal anfärbt, durch ein Transparenzöl durchzieht und dann direkt densitometriert [227]. Auch Phenylcellosolve/Heptan und Propylenglykol/Heptan wurden für die quantitative Bestimmung von sieben 17-Ketosteroiden aus Harn verwendet [211, 221], nur werden hier die Steroide vor der Farbreaktion eluiert. Eine weitere Möglichkeit zur Trennung von C₁₉-sowie C₂₁-Steroiden (relativ schwach polare) bietet sich durch Verwendung der Systeme Formamid/Dekalin bzw. Cyclohexan, Propylenglykol/Methylcyclohexan, Butandiol/Methylcyclohexan [231]. In Verfolgung dieser Arbeiten und unter zusätzlicher Verwendung von Formamid/Methylenchlorid gelang die qualitative Identifizierung von 12 C₁₉O₃-Verbindungen, zur Hauptsache 17-Ketosteroide aus Harnextrakten (s. Schema der Trennung in [321]). Über die zahlreichen Farbreaktionen siehe unter Abschnitt IV 1 e. Wie bereits eingangs gezeigt wurde, eignen sich selbstverständlich auch BUSH-Systeme für die Trennung von C₁₉-Steroiden. Weitere ähnliche Beispiele sind in [341] graphisch dargestellt und in [342] angeführt. Schliesslich ist noch ein reversed phase Verfahren zu erwähnen [201], das mit silikonimprägniertem Papier (5% Dow Corning Silicone No. 1107 in Cyclohexan) und Wasser-Äthanol-Chloroform (6:10:10) als mobile Phase (polarer Anteil) arbeitet, wogegen das Gefäss mit dem unpolaren Anteil equilibriert wird. Die Trennungen scheinen befriedigend zu sein, doch dürfte keinerlei Vorteil gegenüber den oben erwähnten, einfacheren Methoden bestehen.

TABELLE 37

R_S-WERTE (*S* = CORTISOL) VON CORTICOSTEROIDEN²(UV +, BT +) [295]

	<i>F</i> / <i>Bc</i>	<i>P</i> / <i>Tol</i>	<i>F</i> / <i>CHCl₃</i>	<i>B_b</i>	<i>C</i>	<i>C</i> ^{40°}	<i>E₃B</i> ^{40°}	<i>H₃PO₄</i>
17 α ,19-Dihydroxy-cortexon	0.13	0.19	0.36	0.20	0.31	0.35	0.64	rot
6 β ,17 α -Dihydroxy-cortexon	0.31	0.49	0.58	0.44	0.53	0.59	0.90	rötlich orange
6 β -Hydroxy-corticosteron	0.30	0.66	0.50	0.31	0.35	0.40	0.41	o
19-Hydroxy-corticosteron	0.60	0.69	1.37	0.80	0.64	0.77	0.83	blau
Cortisol	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	gelbgrün
6 β -Hydroxy-11-dehydrocorticosteron		1.87	1.62	0.91	0.70	0.75	0.49	blau
Δ^4 -3-Ketopregnentriol(20,20,21)-18-säurelacton (18 \rightarrow 20)		2.46	2.75	2.76	1.81	1.67	1.39	o
Cortison	1.95	2.51	2.39	1.91	1.60	1.38	1.32	bläulich
Aldosteron	1.18	2.59	2.27	1.52	1.03	0.97	0.73	o
19-Hydroxy-cortexon		4.11	2.79	2.34	1.71	1.40	1.24	o
Corticosteron			3.51		2.62			gelbgrün
11 α ,17 α -Dihydroxy-cortexon (<i>epi</i> -Cortisol)		0.20	0.46	0.24	0.25	0.31	0.81	grün
11 α -Hydroxy-cortexon (<i>epi</i> -Corticosteron)		5.07	3.17	2.15	1.42	1.37	1.36	grün

Alle geben die typische gelbe Natronlauge-fluoreszenz mit Ausnahme von 17 α ,19-Dihydroxy-cortexon (blaugrün), 19-Hydroxy-corticosteron (gelb-grünlich) u. 19-Hydroxy-cortexon (blaugrün).

Literatur²S. 252/258.

TABELLE 38

 R_S -WERTE ($S = \text{CORTISOL}$) VON CORTICOSTEROIDEN (UV —, BT +) [295]

	P/Tol	$F/CHCl_3$	B_6	C	C^{100}	E_2B^{100}	H_3PO_4
Allo-TH-Cortisol ($3\beta, 5\alpha$)	0.20	0.22	0.33	0.42	0.57	1.12	violett-orange
TH-Cortisol ($3\alpha, 5\beta$)	0.29	0.28	0.38	0.52	0.63	1.51	violett-orange
Allo-TH-Cortisol ($3\alpha, 5\alpha$)	0.40	0.40	0.55	0.65	0.82	1.37	gelblich-lila
Allo-TH-Cortison ($3\beta, 5\alpha$)	0.40	0.79	0.70	0.60	0.77	1.78	hellblau
TH-Cortison ($3\alpha, 5\beta$)	0.42	1.01	0.89	0.81	0.88	1.92	blau
Allopregnantriol($3\beta, 17\alpha, 21$)-on(20)	2.34	2.50	2.87	2.02	1.63	2.51	rotviolett
Allo-DH-Cortisol (5α)	2.67	1.61	1.86	1.58	1.43	1.40	orange-lila
DH-Cortisol (5β)	2.70	1.43	1.99	1.63	1.51	1.49	orange-lila
Pregnantriol($3\alpha, 17\alpha, 21$)-on(20)	2.80	2.79	2.81	1.99	1.81	2.71	o
Allo-TH-Corticosteron ($3\beta, 5\alpha$)	4.00	2.63	2.64	1.87	1.67	1.61	(blau-violett)
DH-Cortison (5β)	5.31	2.84	2.83	2.04	1.73	1.66	blau
TH-Corticosteron ($3\alpha, 5\beta$)	5.43	2.60	3.24	2.21	2.01	1.62	o
Allo-DH-Cortison (5α)	5.47	3.11	2.80	2.07	1.71	1.60	blau
Allo-TH-11-Dehydrocorticosteron ($3\beta, 5\alpha$)	> 6.00	3.71	3.19	2.23	1.74	1.52	o
TH-11-Dehydrocorticosteron ($3\alpha, 5\beta$)	> 6.00	3.75	3.71	2.28	1.92	2.18	o

(d) C_{21} -Steroide (Corticosteroide)

Neben den Herzglykosiden ist es diese Klasse von Steroiden, die von der Einführung geeigneter Lösungsmittelsysteme ab 1950 [191] vermutlich am meisten profitiert hat. Aus den Tabellen 37-45 [36] ist bereits ersichtlich, welche Lösungsmittelsysteme (Typ ZAFFARONI oder BUSH) sich für die ganz verschieden polaren C_{21} -Steroide eignen und wie sie sich durch R -Werte und Nachweisbarkeit unterscheiden lassen. In erster Linie dienen hier UV-Absorption, Reduktionsteste, Natronlauge-Fluoreszenz, Phosphorsäure, Antimontrichlorid, Trichloressigsäure, Dinitrophenylhydrazin und andere (vgl. hierzu Abschnitt IV 1 e). Durch Kombination ausgewählter Lösungsmittelsysteme und Indikatoren, gelang NEHER UND WETTSTEIN [295] die papierchromatographische Identifizierung aller bisher in den Nebennieren entdeckten Steroide in Mikromengen; vgl. hierzu auch Tab. 37-45 und die graphische Darstellung in [295]. Es wurden hierbei fast alle der in Fig. 4 erwähnten Lösungsmittelsysteme verwendet. Für eine sehr grosse Anzahl von C_{21} -Steroiden mit und ohne Hydroxylgruppe am C_{21} hat REINEKE [150] R_S -Werte für verschiedene Systeme angegeben,

TABELLE 39

 R_S -WERTE ($S = \text{CORTISOL}$) VON CORTICOSTEROIDEN (UV +, BT — UND UV —, BT —) [295]

	P/Tol	$F/CHCl_3$	B_6	C	C^{100}	E_2B^{100}	H_3PO_4
Δ^4 -Pregnentetrol($11\beta, 17\alpha, 20\beta, 21$)-on(3)	0.25	0.48	0.20	0.23	0.32	0.68	gelb*
Δ^4 -Pregnentriol($17\alpha, 20\beta, 21$)-dion($3, 11$)	0.84	1.48	0.67	0.50	0.58	0.70	o*
Δ^4 -Pregnentriol($17\alpha, 20\alpha, 21$)-dion($3, 11$)	0.95	1.59	0.72	0.46	0.58	0.72	o*
Δ^4 -Pregnendiol($20\beta, 21$)-dion($3, 11$)	2.41	2.94	1.89	1.34	1.39	1.40	o*
Allopregnanpentol($3\beta, 11\beta, 17\alpha, 20\beta, 21$)	0.04	0.04		0.10	0.13	0.67	rot**
Allopregnantetrol($3\beta, 17\alpha, 20\beta, 21$)	0.47	0.46		1.03	1.12	1.88	(rötlich)**

* UV +

** UV —

TABELLE 40

R_S -WERTE ($S =$ CORTICOSTERON) VON OXYGENIERTEN CORTEXONDERIVATEN
(MITTELPOLARE CORTICOSTEROIDE U.A.M.), ALLE UV +, BT + [36]

<i>Hydroxy-cortexon</i>	<i>P/Tol</i>	<i>F/Be</i>	<i>F/Be-CHCl₃</i> (1:1)	<i>BL₁</i>	<i>BL₁^{3M2}</i>	<i>F/Cy-Be</i> (1:1)	<i>H₃PO₄</i>
16 α -	0.19	0.16	0.41		0.31		
15 α -	0.23	0.19	0.45		0.27		
19-	0.28		0.49	0.40			
11 α -	0.35		0.56	0.41			grün
7?	0.40	0.26	0.51		0.47		
12 α -	0.46	0.49	0.77		0.70		
18-	0.58		0.73	0.69		0.44	
6 β -	0.59		0.73	0.69		0.49	
14 α -	0.70	0.69	0.90		0.79		
17 α -	0.77		0.98	1.06		0.99	rotorange
8- od. 9-	0.90	0.64	0.86		0.77		
11 β - (= Corticosteron)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	gelbgrün
11-Dehydrocorticosteron	2.30		1.36	1.42			(schwach blau)
Cortexon	4.00		1.68	2.19	1.69		(orange)

Alle zeigen die typische gelbe NaOH-Fluoreszenz mit Ausnahme von 19-Hydroxycortexon (blaugrün) und 7 α -Hydroxycortexon (negativ!). Über vergleichbare R_S -Werte ($S =$ Corticosteronacetat) der Acetate von Corticosteroiden siehe Tab. 2 in [295].

TABELLE 41

R_S -WERTE ($S =$ CORTICOSTERON) VON CORTICOSTEROIDEN (UV —, BT +) [36]

	<i>P/Tol</i>	<i>F/Be-CHCl₃</i> (1:1)	<i>BL₁</i>	<i>H₃PO₄</i>
Allopregnantriol(3 β ,17 α ,21)-on(20)	0.14	0.50	0.64	rotviolett
Pregnantriol(3 α ,17 α ,21)-on-(20)	0.18	0.53	0.32	(orange)
Allo-TH-Corticosteron (3 β ,5 α)	0.24	0.48	0.41	(blauviolett)
TH-Corticosteron (3 α ,5 β)	0.32	0.63	0.77 (38°)	o
DH-Cortison (5 β)	0.30	0.68	0.26	blau
Allo-DH-Cortison (5 α)	0.32	0.46	0.31	blau
Allo-TH-11-Dehydrocorticosteron (3 β ,5 α)	0.48	0.83	0.86	o
TH-11-Dehydrocorticosteron (3 α ,5 β)	0.60	0.97	0.71	o
Allo-DH-Corticosteron (5 α)	1.81	1.35	1.43	o
	(tailing)			
Pregnantriol(17 α ,21)-dion (3,20)	1.57	1.34	1.46	(orange)
	(tailing)			
Allo-TH-Cortexon (3 β ,5 α)	2.03	1.76	2.03	o
DH-11-Dehydrocorticosteron (3 α ,5 β)	2.81	1.68	1.73	o
Allo-DH-11-Dehydrocorticosteron (3 β ,5 α)	3.02	1.62	1.69	o

deren Wiedergabe hier zu weit führen würde. Teilweise sind diese Steroide in den eigenen Tabellen dieses Kapitels enthalten. Zu erwähnen sind jedoch die weniger bekannten, aber ebenfalls bewährten Lösungsmittelsysteme [150, 378]: Carbitol (= Diäthylenglykol-monoäthyläther)/Methylcyclohexan und Carbitol-Formamid (1:1)/Hexan. Es sei hier vor allem auch auf die sehr nützlichen Angaben von ZAFFARONI [178, 233] sowie diejenigen von BUSH in [105, 177, 181] und SAVARD [180, 232]

Literatur S. 252/258.

TABELLE 42

 R_s -WERTE ($S = \text{CORTICOSTERON}$) VON CORTICOSTEROIDEN
(UV +, BT — UND UV —, BT —) [36]

	P/Tol	$F/Be-CHCl_3$ (1:1)	BL_1	
Δ^4 -Pregneniol(20 β ,21)-dion(3,11)	0.16	0.47	0.31	*
Δ^4 -Pregneniol(17 α ,20 β ,21)-on(3)	0.20	0.50	0.39	*
Δ^4 -Pregnenol(17 α)-dion(3,20)	3.11	1.85	1.27	J-KJ: blau*
Allopregnantriol(3 β ,17 α ,20 α)	0.30	1.06	1.11	$SbCl_5$ rötlich**
Pregnantriol(3 α ,17 α ,20 α)	0.40	1.07	1.08	blau**
Allopregnantriol(3 β ,17 α ,20 β)	0.42	1.28	1.15	rötlich**
Allopregnandiol(3 β ,17 α)-on(20)	1.12	1.68	2.13	**

* UV + ** UV —

TABELLE 43

 R_s -WERTE ($S = \text{CORTEXON}$) VON C_{21} -STEROIDEN UND IHREN ACETATEN
(UV +, BT +) [36, 295]

	P/Tol	$F/Cy-Be$ (1:1)	B_3	A^{380}	
Corticosteron	0.24	0.04	0.07		
17-Hydroxycortexon	0.14	0.05			
11-Dehydrocorticosteron	0.55	0.13	0.15		
1-Dehydrocortexon	0.77	0.60	0.64	0.38	
Cortisonacetat	0.34	0.08	0.11		
Corticosteronacetat	0.84	0.51	0.61		
17-Hydroxycortexonacetat	0.79	0.67	0.68		
11-Dehydrocorticosteronacetat	1.11	0.96	0.81		
Cortexonacetat	1.33	1.66	1.62	2.48	
19-Hydroxycortexon-21-acetat	0.45	0.14	0.12		} NaOH-Fluoreszenz blaugrün
19-Hydroxycortexon-19-acetat	0.97	0.56	0.45		
19-Hydroxycortexon-19,21-diacetat	1.25	1.51	1.19	1.00	
6 β -Hydroxycortexon-diacetat		1.57		1.45	
6 α -Hydroxycortexon-diacetat			1.48	1.78	

TABELLE 44

 R_s -WERTE ($S = \text{CORTEXON}$) VON C_{21} -STEROIDEN (UV —, BT + UND UV —, BT —) [36]

	P/Tol	$F/Cy-Be$ (1:1)	B_3	
Pregnantriol(3 α ,17 α ,21)-on(20)	0.36	0.21	0.33	*
Allo-DH-Corticosteron(5 α)	0.49	tailing	0.24	*
Δ^6 -Pregneniol(3 β ,21)-on(20)	0.47	0.77	0.68	*
Allo-DH-Cortexon (3 β ,5 α)	0.48	0.87	0.79	*
DH-11-Dehydrocorticosteron (5 β)	0.75	0.32	0.35	*
Allo-DH-11-Dehydrocorticosteron (5 α)	0.80	0.33	0.37	*
Pregnanol(21)-trion(3,6,20)	0.81	0.12		NaOH-Fluoreszenz gelb!*
Allopregnanol(3 α)-dion(11,20)	0.88			1.10 (F/Be)**
Allopregnanol(3 β)-on(20)	1.05	1.70		**
Δ^6 -Pregnenol(3 β)-on(20)	1.04	1.87	1.37	2.96 (A^{380})**

* BT + ** BT —

TABELLE 45

 R_S -WERTE ($S = \text{CORTEXON}$) VON C_{21} -STEROIDEN UND DERIVATEN (UV+, BT--) [36]

	D/Tol	$F/Cy-Be$ (1:1)	B_a	A^{300}	
17 α -Hydroxyprogesteron	0.73	0.93	0.78	0.64	
11-Ketoprogesteron		1.35	1.09	1.23	
Progesteron	1.28	1.86	1.66	4.78	NaOH-Fluoresz. schwach
1-Dehydro-progesteron		1.84	1.41	2.50	NaOH-Fluoresz. negativ
Δ^4 -Pregnenol(20 α)-on(3)	0.88	1.50	1.17	1.16*	
Δ^4 -Pregnenol(20 β)-on(3)	0.99	1.59	1.29	1.82*	
Δ^4 -3,11-Diketo Δ^4 -cholesteron-methylester	1.21	1.78	1.38	2.08	
Δ^4 -3-Keto-18-hydroxy- Δ^4 -cholesteron- 20 \rightarrow 18-lacton		0.90			
Δ^4 -3-Keto-11 β -hydroxy-18-oxo- Δ^4 -cholesteron- 20 \rightarrow 18-lacton (Aldosteronlacton)		0.47	0.36		
11 β -Hydroxyprogesteron-18-s α -lacton		0.32	0.29		

* 22° C

TABELLE 46

LÖSUNGSMITTELSYSTEME VON EBERLEIN UND BONGIOVANNI [347]

NB ₁	Isooctan-Toluol-Methanol-Wasser	(25:25:35:15)
NB ₂	Isooctan-Toluol-Methanol-Wasser	(16.5:33.5:30:20)
E ₁	Isooctan-Methanol-Wasser	(50:45:5)
E ₂ B	Isooctan- <i>tert.</i> -Butanol-Wasser	(50:25:45)
E ₄	Isooctan- <i>tert.</i> -Butanol-Methanol-Wasser	(50:22.5:22.5:5)
E ₅	Isopropyläther- <i>tert.</i> -Butanol-Wasser	(40:25:30)
E ₆	Hexan- <i>tert.</i> -Butanol-Methanol-Wasser	(50:22.5:22.5:20)

hingewiesen, die im einzelnen bereits an anderer Stelle dieses Kapitels diskutiert worden sind. Die BUSH-Technik wurde auch insofern variiert, indem man, um die Equilibrierungszeit zu vermeiden, das Papier direkt mit einer Lösung von Aceton-Wasser 7:3 tränkte und dann wassergesättigte Mischungen von Hexan, Benzol, Toluol und Alkoholen als mobile Phase verwendete [345]. Die ursprüngliche Methode hat sich jedoch bisher behaupten können. Verschiedene Varianten über P_{USH}-systeme, besonders für stark polare Corticosteroide sind von PECHET [346] angegeben worden, wobei die Papiere ebenfalls zuerst mit der wässrigen Phase imprägniert werden. Interessantere Varianten haben EBERLEIN UND BONGIOVANNI [347] eingeführt (vgl. Tab. 46). Sie equilibrieren etwa 10° höher als nachher chromatographiert wird. Nach unseren Erfahrungen erhält man jedoch gleichmässige Ergebnisse wenn die Temperatur über die ganze Zeit konstant gehalten wird, vorteilhaft wie bei den BUSH-Systemen auf etwa 38°. Von den neuen Systemen erwies sich besonders das E₂B genannte für Corticosteroide als nützlich (s. Tab. 37-39), da die Sequenz der R_S -Werte teilweise eine andere ist als bei den übrigen Systemen (vgl. auch [305]). Neuerdings ist auch wieder Äthylenglykol/Toluol statt Propylenglykol/Toluol für spezielle

TABELLE 47

R_F-WERTE VON RELATIV SCHWACHPOLAREN STEROIDEN UND IHREN ESTERN
IN ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER CHROMATOGRAPHIE-BEDINGUNGEN [304]

System	A (Bush)*	a	b	c	
Stationäre Phase	80%ig Methanol	80%ig Methanol	70%ig Methanol	80%ig Methanol	80%ig Methanol
Mobile Phase	Leichtpetroleum 80-100°	Ligroin 90-100°	n-Hexan	Leichtpetroleum 55-65°	Leichtpetroleum 55-65°
Technik	absteigend	absteigend	absteigend	aufsteigend	aufsteigend
Substanz	Temperatur	34°	37°	37°	37°
Papier	Whatman No. 4	Schleicher u. Schüll 2045b	Schleicher u. Schüll 2045b	Whatman No. 4	Whatman No. 1 Schleicher u. Schüll 2043a, b, 2040b
Equilibrirung	bis 12 Std.	1-12 Std.	1-6 Std.	1 Std.	1 Std.
Laufzeit	45 cm in 100-180 min	20 cm in 120 min	20 cm in 120 min	19-25 cm in 60 min	19-25 cm in 60 min
Androsteron	0.40		0.15	0.13	0.08
β-Methylandrosterdiol				0.16	0.11
α-Methyltestosteron				0.28	0.18
Dehydroepiandrosteron		0.38	0.36	0.29	0.19
β-Athyandrosterdiol				0.31	0.21
Androsteron			0.36	0.33	0.29
1-Androstendion	0.70		0.39	0.34	0.25
β-Oestradiolmonoacetat				0.36	0.25
Ortetonacetat	0.70	0.54	0.50	0.42	0.27
1-Androstendion				0.50	0.37
Androsteron		0.60	0.63	0.51	0.38
11opregnanol(3β)-on(20)				0.53	0.38
5-Pregnenolon		0.61	0.65	0.54	0.31
β-Oestradioldiacetat				0.61	0.49
Progesteron	0.85	0.72	0.73	0.68	0.51**
11, 12-Dehydroprogesteron		0.72	0.73	0.68	0.51**
β-Oestradiolmonobenzoat				0.81	0.65
5-Androstendiolmonoacetat				0.85	0.70
Dehydroepiandrosteronacetat		0.92	0.92	0.93	0.81
5-Androstendioldiacetat		0.93	0.93		
2 oder Δ ¹³ -Androsteron				1.00	0.88
5-Pregnenolonacetat				1.00	0.94
Cholesterin		0.93	0.94		

* In der 1. Spalte sind die Originalwerte von BUSH für das System A vergleichsweise aufgeführt.
** 0.38 bei Schleicher und Schüll-Papier 2045b.

Zwecke verwendet worden [348], während wasserfreie Nylol-Methanol-Systeme [349] keinen ersichtlichen Vorteil bieten. Für schwach polare C₂₁O₂ und C₂₁O₃-Steroide hat AXELROD [231] neben bereits erwähnten Systemen Formamid/Decalin und 1,3-Butandiol/Methylcyclohexan verwendet. Die Wandergeschwindigkeit in cm/Std. von sehr hoch polaren Corticosteroiden mit einigen üblichen Systemen ist in [350] angegeben. Über die relativen Wandergeschwindigkeiten von Aldosteron und seinen

Acetaten vgl. [295] und [351]. GRAY *et al.* [352] geben u.a. folgende R_F -Werte im BUSH B_5 -System für:

Prednisolon	0.22
Cortisol	0.31
Prednison	0.44
Cortison	0.46

Noch ausgeprägtere Unterschiede zwischen Δ^4 - und $\Delta^1, 4$ -3-Ketosteroiden sind mit einigen ZAFFARONI-Systemen erhältlich. Als weitere Systeme für Corticosteroide sind noch Butanol-Wasser [335] und Heptanol-Wasser [206, 207] verwendet worden, letzteres als reversed phase System, doch sind diese den meisten anderen aus dem einen oder anderen Grund unterlegen. ZANDER *et al.* [304] haben eine Reihe von BUSH-Varianten für die Chromatographie relativ schwach polarer Steroide im Hinblick

TABELLE 48

MITTLERE R_F -WERTE UND FARBREAKTIONEN VON PROGESTERON-METABOLITEN [353]

	P/Tol	B_1	$SbCl_5$	$ZnCl_2$
			UV-Fluoreszenzen	
Pregnantriol(3 α , 17 α , 20 α)	0.08	0.44	rot	blau
Allopregnandiol(3 β , 20 α)	0.31	0.77	rosa	blau
Pregnanndiol(3 α , 20 α)	0.32	0.73	gelborange	blau
Allopregnandiol(3 α , 20 α)	0.35	0.71	rosa	blau
Allopregnandiol(3 β , 20 β)	0.41	0.78	rosa	blau
17 α -Hydroxyprogesteron	0.59	0.79	blau	blau
Δ^5 -Pregnenol(3 β)-on(20)	0.78	0.88	rot	rosa
Allopregnanol(3 β)-on(20)	0.86	0.89	blau	o

TABELLE 49

 R_F -WERTE VON PREGNANTRIOLN UND ÄHNLICHEN STEROIDEN IM SYSTEM ISOCTAN-TOLUOL-METHANOL-WASSER (5:15:16:4), 22° C [242]

	R_F -Wert	Farbreaktion mit Trichloressigsäure	
		im Tageslicht	im UV-Licht
Pregnantriol(3 α , 17 α , 20 α)	0.33	blau	blau
Pregnantriol(3 α , 17 α , 20 β)	0.42	blau	blau
Allopregnantriol(3 α , 17 α , 20 α)	0.38	blau	beigegrau
Allopregnantriol(3 α , 17 α , 20 β)	0.48	blau	beigegrau
Δ^5 -Pregnenatriol(3 β , 17 α , 20 α)	0.26	violett	rosa
Δ^5 -Pregnenatriol(3 β , 17 α , 20 β)	0.33	violett	rosa

Entsprechende Verbindungen mit 11-Ketogruppe zeigen teils keine Farbreaktionen.

auf ihre Eignung besonders für Progesteron untersucht (s. Tab. 47) und für letzteres auch optimale Bedingungen der Nachweisbarkeit geprüft und auf dieser Basis eine Bestimmungsmethode für Progesteron ausgearbeitet. Progesteron-Metaboliten, insbesondere Pregnanndiole und Pregnantriole, lassen sich z.B. in Propylenglykol/Toluol, Bush B_4 oder Toluol-Isoctan-Methanol-Wasser (15:5:16:4) trennen und mit

Literatur S. 252/258.

Antimontrichlorid, Zinkchlorid oder Trichloressigsäure [242] nachweisen [242, 256, 353]. Tab. 48 und 49 enthalten einige R_F -Werte und Farbreaktionen.

Zur quantitativen Bestimmung vgl. Abschnitt IV 1 i und [354]. Die Auswertungsmöglichkeiten auf Grund von UV-Absorption, Reduktionstesten, Natronlauge-Fluoreszenz etc. sind hier sehr zahlreich, besonders günstig in Fällen wo der Fleck radiochemisch lokalisiert werden kann [160, 289, 355]. Auch die Densitometrie von Formazanflecken direkt auf den transparent gemachten Chromatogrammen ist hier erwähnenswert [235]. Auf weitere Anwendungsbeispiele, deren Studium für die papierchromatographische Technik immerhin sehr empfehlenswert ist, kann nur hingewiesen werden: Papierchromatographische Analyse von Corticosteroiden und ihren Metaboliten aus Urin [322, 333] und Rinder-Nebennieren [280]; Bestimmung von Aldosteron in Nebennieren [139] oder Harn [219, 305], Isolierung von Corticosteroiden [295]. Schliesslich wären als weitere interessante Anwendungsbeispiele u.a.

TABELLE 50

R_F -WERTE VON HERZGLYKOSIDEN UND AGLYKONEN [228, 245, 248, 367]

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Digitalinum verum					0.95	F			0.16
Gitorin					0.78	F			
Digilanid C	0.08	0.12	0.15		0.86	F	0.25		0.33
Digilanid B	0.14	0.18	0.25		0.66	F	0.10		0.47
Digilanid A	0.37	0.46	0.49		0.28	F	0.03		0.85
Desacetyldigilanid C	0.01	0.01	0.02						0.13
Desacetyldigilanid B	0.02	0.03	0.05		0.73	F			0.19
Desacetyldigilanid A	0.07	0.10	0.15		0.39	F			0.50
Strospesid								0.75	0.61
Digoxin	0.68	0.75	0.76		0.29	0.72		0.16	
Digoxigenin	0.58	0.64	0.61					0.32	
Gitoxin	0.76	0.81	0.82	0.40	0.18	0.55		0.29	
Gitoxigenin	0.82	0.84	0.84	0.80	0.17	0.52		0.42	
Acetyldigoxin- α								0.39	
Acetyldigoxin- β								0.45	
Acetylgitoxin- α					0.08	0.41		0.59	
Acetylgitoxin- β								0.64	
Digitoxin	0.88	0.91	0.90	0.68	0.03	0.27		0.69	
Digitoxigenin	0.92	0.93	0.92	0.91	0.03			0.81	
Acetyldigitoxin- α und - β					0.02	0.21		0.90-0.95	
Oleandrin								0.93	
Oleandrigenin								0.72	
Nervifolin								0.55	
Cymarin								0.55	
Allocymarin								0.48	
Strophanthidin								0.40	
Allostrophanthidin								0.32	
Isostrophanthidin								0.76	
Strophanthidol								0.26	
Cymarol								0.30	
Emicymarin								0.11	
Alloemicymarin								0.07	

Lösungsmittelsysteme I-IX siehe Text.

F = Lösungsmittelfront.

Literatur S. 252/258.

zu erwähnen: Identifizierung von Nebennierenrindenhormonen im menschlichen Plasma [341], in menschlichen Nebennieren und Nebennierentumoren [323], Isolierung von Aldosteron aus Harn [356], Identifizierung von Corticosteroid-Metaboliten aus Harn [296], chemische Bestimmung von Progesteron [215].

(e) *Glykoside und Aglykone (Cardenolide, Bufadienolide)*

Die Papierchromatographie hat sich auch auf diesem Gebiet als äusserst fruchtbar erwiesen; es ist dementsprechend eine grosse Anzahl von Arbeiten erschienen, die die chromatographische Methodik dieser hochpolaren Stoffgruppe ständig verbessert haben. Neben vielen wässrigen Systemen haben sich auch hier die für Steroide entwickelten ZAFFARONI- und BUSH-Systeme verwenden lassen, wobei im allgemeinen die Chromatographie auf Blättern derjenigen auf Streifen vorgezogen wird.

(1) *Digitalis- und Strophanthus-Glykoside und Aglykone*. Bereits 1950 ist von SVENDSEN UND JENSEN [245] eine brauchbare Methode angegeben worden. Sie verwendeten Chloroform-Methanol-Wasser-Gemische (I-III in Tab. 50) zur Chromatographie und Trichloressigsäure als Reagens; die Reaktion ist viel empfindlicher für Purpureaglykosid B und Digilanid B sowie deren Spaltungsprodukte (intensiv blau), als für die entsprechenden A-Glykoside und Spaltungsprodukte (rötlich); Digilanid C, Digoxin und Digoxigenin geben stahlblaue Farben. Die Systeme erlauben jedoch im

TABELLE 51

LAUFSTRECKEN VON HERZGLYKOSIDEN, AGLYKONEN UND IHREN ACETATEN IN CM [243]

Substanz	F/Benzol		P/Toluol	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.
Periplogenin	2.8	4.2	0.7	2.7
Periplogenin-acetat	21.6	43.6	6.9	16.9
Alloperiplogenin-acetat	15.0	32.0	6.6	
Alloperiplocymarin	11.8	28.9	2.5	7.1
Periplocymarin	16.2	38.9	3.8	10.0
Emicymarin	0.8	1.1	0.7	3.0
Emicymarin-acetat			13.6	23.4
Alloemicymarin	1.0	1.4	1.0	2.5
Cymarol	2.5	3.6	1.0	3.0
Strophanthidol	2.0	2.6	0.6	1.4
Strophanthidol-acetat	8.3	15.8	4.7	12.0
Strophanthidin-acetat	4.1	6.1	2.8	7.1
Cymarin	4.0	6.2	2.0	5.1
Cymarin-acetat			15.1	
Sarmentocymarin	3.3	4.1	0.8	3.1
Sarmentogenin	2.5	2.5	1.0	2.0
Sarmentogenin-acetat			15.5	25.3
Sarmentosid A	2.3	2.3	0.7	1.3

allgemeinen nur den Einsatz von je 5 γ Substanz wegen der Tendenz zur Schwanzbildung. Die Methodik ist später verbessert worden durch Verwendung des ZAFFARONI-Systems Formamid/Benzol-Chloroform (4:6) und von mehreren Farbreaktionen wie Antimontrichlorid, DNB, Pikrinsäure, Nitroprussid-Natium etc. (vgl. Nachweisreak-

tionen Abschnitt IV 1 e: [228]), und durch fluorometrische Bestimmung der Eluate *in vitro* [357]. Formamid/Chloroform und Benzol-Chloroform-Gemische wurden 1951 bereits von SCHINDLER UND REICHSTEIN [229] für die Chromatographie von zahlreichen Glykosiden und Aglykonen aus Strophanthus-Samen eingeführt. Die Autoren geben relative Zahlen an für die Wanderungsgeschwindigkeit und bemerkten, dass viele Monoglykoside rascher wandern als die Aglykone. HEFTMANN *et al.* [234, 243] verwenden ebenfalls ZAFFARONI-Systeme wie Formamid/Benzol und Propylenglykol/Toluol im Durchlaufchromatogramm. Die so erhaltenen Laufstrecken einiger Car-

TABELLE 52

R_F-WERTE UND FARBREAKTIONEN VON EINIGEN HERZGLYKOSIDEN IM SYSTEM
METHANOL-CHLOROFORM-WASSER (10:10:6) [273]

Substanzen	<i>R_F</i> -Werte	Anisaldehyd-Eisessig-Schwefelsäure-Reagens		Reagens nach Raymond	Reagens nach Legal
		sichtb. Licht	UV-Licht	sichtb. Licht	sichtb. Licht
Diginin	0.24	grünblau	dunkelblau	blau	rot
Digitoxin	0.51	grünblau	dunkelblau	blau	rot
Gitoxin	0.70	grünblau	hellblau	blau	rot
Saponin	0.77	gelb	dunkelviolett	—	—
Gitoxigenin	0.84	—	hellblau	blau	rot
Purp.-glyk. A	0.84	grünblau	hellblau*	blau	rot
Purp.-glyk. B	0.93	grünblau	hellblau	blau	rot

* Die an sich dunkelblaue Fluoreszenz des Purpureaglykosids A wird durch die hellblaue Fluoreszenz des Gitoxigenins, welches den gleichen *R_F*-Wert aufweist, überdeckt.

TABELLE 53

R_F-WERTE EINIGER AGLYKONE UND DERIVATE IM SYSTEM BUSH B₅ [208]

Substanz	<i>R_F</i> -Wert
"β"-Anhydrodigitoxigenin	0.91
"α"-Anhydrodigitoxigenin	0.63
"β"-Anhydrodigoxigenin	0.73
"β"-Anhydrodigoxigenon	0.59
"β"-Anhydrosarmentogenin	0.69
"β"-Anhydrouzarigenin	0.94
Digitoxigenin	0.76
Digitoxigenin-acetat	0.89
Digoxigenin	0.075
Digoxigenin-diacetat	0.70
Digoxigenon	0.68
Gitoxigenin	0.26
Gitoxigenin-diacetat	0.88
Periplogenin	0.43
Sarmentogenin	0.10
Sarmentogenin-diacetat	0.85
Sarvid-mono(?)acetat	0.72
Sarverogenin	0.40
Strophanthidin	0.16
Strophanthidol	0.05
Uzarigenin	0.83

denolide sind in Tab. 51 wiedergegeben, eine graphische Darstellung in [234], Farbreaktionen mit Trichloressigsäure und Tollens Reagens in [243]. HASSALL UND MARTIN berichteten 1951-[326] über ihre Versuche mit verschiedenen Mischungen aus Wasser, Ester, Ketonen, Alkoholen, Chloroform und Natriumbenzoat, welche zum Teil brauchbare Systeme darstellten (vgl. auch JAMINET [241, 246]). Es folgten weitere Varianten auf dieser Basis (Acetylderivate von Gitoxigenin [358], Digitalis [244, 359, 360]), teilweise unter Verwendung von mit Silikon hydrophobierten Papieren [203, 273] und aromatischer Aldehyde als Indikatoren [203, 273, 276], vgl. Tab. 52. Inzwischen ist auch das System B₅ von BUSH mit Erfolg zur Trennung herangezogen worden ([208], s. Tab. 53). Weiterhin wurden auch mit butanolgesättigtem Wasser teilweise gute Chromatogramme erhalten [257]. Allerdings ist hier der R_F -Wert der glukosefreien Substanzen der Purpurea- und Lanata-Gruppe recht klein. Entweder bedient man sich daher des Durchlaufchromatogramms oder eines Zusatzes von Eisessig oder Methanol: Butanol-Eisessig (bzw. Methanol)-Wasser (5:1:5); die wässrige Phase ist für die Purpurea- und Lanata-Gruppe, die Butanol-Phase für die Strophanthus-Gruppe geeignet. Auch eine quantitative Auswertung erscheint möglich. Für die Bestimmung der Komponenten in Digitalisproben benützten SILBERMAN UND THORP [287] Essigester-Benzol-Wasser mit 1.5–7.5% Alkohol und Fluoreszenzphotographie mit densitometrischer Auswertung. Das System wurde später offensichtlich verbessert durch zusätzliche Verwendung von Chloroform [361]. Solche Systeme wurden weiterhin vielfach abgewandelt und je nach Bedarf bloss für Gruppentrennungen oder Einzeltrennungen der Digitalisglykoside und Genine verwendet [363]. Noch kompliziertere Lösungsmittelgemische [364] befriedigten kaum. Mit einem reversed phase System konnten TSCHESCHE *et al.* [248] gute Resultate erreichen. Das Papier wird hierbei mit der organischen Phase der Gemische Octanol-Pentanol-Wasser-Formamid 5:6:8:2 (V), 6:2:1:4 (VI) oder z.B. Pentanol-Wasser 1:1 (VII) imprägniert und die wässrige Phase dient als mobile (s. Tab. 50). Die quantitative Bestimmung erfolgt in den Eluatzen mit Xanthidrol. Für die Cardenolide aus *Convallaria majalis* werden nebst den obigen Systemen noch Isobutanol-Wasser (VIII) und Butanol-Pyridin-Wasser 3:1:3 (IX, Tab. 50) nach folgendem Schema verwendet [362]:

Substanzen	Systeme				
	V	VI	VII	VIII	IX
Genine + Anhydrogenine	+	+			
Acetate	+				
Vallarotoxin	+				
Majalosid, Convallatoxin, Convallatoxol			+	+	
Convallosid, Convallatoxosid, Gluco-Convallosid			+	+	+

In Weiterentwicklung ihrer Methodik (s. oben) haben REICHSTEIN *et al.* [365] ausgezeichnete Systeme für stark polare Glykoside und Aglykone gefunden, wobei mit Wasser getränktes Papier als stationäre Phase und *n*-Butanol oder *n*-Butanol-Toluol-Gemische als mobile Phase dienten. Letzteres System ist besonders brauchbar für

Literatur S. 252/258.

Convallatoxin, Digitalinum-verum-monoacetat, Gofrusid, Frugosid, Nigrescigenin, Odorobiosid-G-monoacetat, Odorotriosid-G-monoacetat, Sargenosid-diacetat, Thevetiosid, Thevetin; das Wasser-Butanol-System für: Acolongiflorosid K, Ouabain, Sarmentosid A, *k*-Strophanthin- β , *k*-Strophanthosid, Uzarin. Gelegentlich tritt eine leichte Schwanzbildung auf. Die Resultate sind in graphischer Form wiedergegeben. Diese Systeme sind seither von der REICHSTEIN-Gruppe für den Nachweis von zahlreichen anderen Glykosiden ausgiebig und mit gutem Erfolg benützt worden, wie aus den vielen Arbeiten in den letzten Jahrgängen der *Helvetica Chimica Acta* hervorgeht. Als besonders instruktive Beispiele seien hier lediglich die Isolierungen aus *Strophanthus ledienii* [87, 89], *Erysimum crepidifolium* [90] und *Glossostelma spathulatum* [366] erwähnt, wobei auch eine grosse Anzahl von Farbreaktionen beschrieben wurde. Für die vollständige Trennung von Digitalisglykosiden und Aglykonen im aufsteigenden Chromatogramm gibt KAISER [367] 2 neue Lösungsmittelgemische vom ZAFFARONI-Typ an: Formamid/Xylol-Methyläthylketon (1:1) für die Glykoside der Digitoxinstufe und Aglykone und Formamid/Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid (5:5:0.65) für die Primärglykoside (s. VIII und IX in Tab. 50). System VIII ist ausserdem für zahlreiche andere wenig wasserlösliche Herzglykoside gut geeignet. Ausserdem werden noch weitere, ähnliche Lösungsmittelsysteme für spezielle Trennungen sowie die Möglichkeiten zur Identifizierung der in den Herzglykosiden vorkommenden Zucker beschrieben. Nach der Methode der Mehrfachchromatographie in Formamid/Xylol-Methyläthylketon (2:1 oder 3:1) lassen sich die α - und β -Formen von Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin trennen. Über eine Variante mit Äthylenglykol/Chloroform vgl. [368].

(2) *Glykoside und Aglykone vom Scilla-Bufo-Typ*. Für die Chromatographie selbst eignen sich Lösungsmittel wie sie bei den Herzglykosiden beschrieben worden sind. Als besonders vorteilhaft erwiesen sich folgende Varianten vom ZAFFARONI-Typ: Propylenglykol-Wasser (4:1)/Benzol-Petroläther (1:1) oder Benzol-Chloroform (1:1) sowie Formamid/Benzol-Chloroform (6:4) [96, 369], wobei die Resultate teils graphisch [96] teils nach R_F -Werten [369] angegeben sind. Als Nachweis dient in erster Linie die Farbreaktion mit Antimontrichlorid (Angabe der verschiedenen Farben s. [96, 369]) sowie die Photokopie mit einer Filterkombination bei 300–350 $m\mu$, womit der für den Scilla-Bufo-Typ charakteristische Cumalinring spezifisch erfasst wird [225]. Die neueste Zusammenstellung findet sich in [385].

(f) *Saponine und Sapogenine*

Für Saponine haben sich bisher wässrige Systeme am besten bewährt und zwar teils saure wie z.B. *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5) [275, 286], teils neutrale wie Chloroform oder Benzol in Mischungen mit verschiedenen wässrigen Alkoholen (Butanol, Isoamylalkohol) oder selbst basische, wie Benzol-Butanol-Pyridin-Wasser (10:4:1:5) [275]; Antimontrichlorid, aromatische Aldehyde oder Perjodat-Permanganat (s. Nachweisreaktionen IV 1 e) dienen als Indikatoren.

Etwas zahlreicher sind die Angaben über Sapogenine. Von SANNIÉ *et al.* [259, 260, 370] wurden zuerst Benzin-Chloroform-Essigsäure-Systeme vorgeschlagen, die *Literatur S. 252/258*.

sich hauptsächlich für die Trennung in verschiedene Gruppen eignen dürften. Neutrale wässrige Systeme wie Petroläther-Toluol-Äthanol-Wasser in Mischungsverhältnissen von 0-40:40-0:1-3:9-7 [247] scheinen jedoch vorteilhaftere Resultate zu liefern, teilweise auch für die Sapogenin-acetate. Schliesslich erwiesen sich auch Systeme vom ZAFFARONI-Typ mit Carbitol oder Formamid als stationäre und Hexan-Octan oder Benzol als mobile Phase [274] als durchaus nützlich, teilweise im Durchlaufchromatogramm unter Benützung von Leitfarbstoffen. In vielen Fällen wird auch auf diesem Gebiet die Anwendung beider Typen von Systemen vorteilhaft sein, vgl. auch [383]. Die Sapogenine lassen sich z.B. mit Antimontrichlorid, Trichloressigsäure, aromatischen Aldehyden oder auf biologischem Wege (auch auf dem Papier) durch ihre Fähigkeit, Blut zu hämolysieren, nachweisen [247].

(g) Gallensäuren, Steroidcarbonsäuren

Während sich für die Säureester je nach Polarität die für die Steroidchromatographie üblichen neutralen Systeme vom BUSH- oder ZAFFARONI-Typ eignen (vgl. auch [371]), sind für die freien Säuren saure oder basische Systeme zu verwenden. Als letztere dienen beispielsweise *n*-Propanol-NH₄OH-Wasser (90:2:8) oder besser *n*-Propanol-Äthanolamin-Wasser (90:5:5) [372], Collidin-Wasser (10:3.5) in Ammoniakatmosphäre [261] oder Isoamylalkohol gesättigt mit 3 *M*-Ammoncarbonatpuffer bzw. 2%ig. Ammoniak [271]. Als saure Systeme haben sich z.B. folgende bewährt: stationäre Phase 70%ige Essigsäure (Imprägnierung der Papiere), mobile Phase Isopropyläther-Heptan 6:4, 2:8 oder 8.5:1.5 [251, 252]; Butanol, gesättigt mit 3%iger wässriger Essigsäure [251], 80%ige Essigsäure [271] und Toluol-Essigsäure-Wasser 1:1:2 [240]. Diese Systeme sind meist auch für die konjugierten Tauro- und Glyko-Gallensäuren geeignet, wobei auf- oder absteigend chromatographiert werden kann. Als Nachweis dienen u.a. Antimontrichlorid, Phosphorsäure, Phosphomolybdänsäure, aromatische Aldehyde und in Spezialfällen Jodkaliumjodid (vgl. Nachweisreaktionen Abschnitt IV 1 e) und im besonderen die Angaben über zahlreiche Säuren und Ester in [271]. Gallensäuren mit reaktiven Ketogruppen lassen sich auch als GIRARD-Derivate chromatographieren [373], im allgemeinen aber wird man das Arbeiten mit freien Säuren oder ihren Estern vorziehen. Zur quantitativen Bestimmung von papierchromatographisch getrennten Gallensäuren vgl. [374, 375], zur autoradiographischen Auswertung [261].

(h) Steroid-Konjugate

Wie bei den Gallensäuren handelt es sich hier um saure Verbindungen (Konjugation mit Glucuron- oder Schwefelsäure) für welche sich einige wässrige Systeme gut zu bewähren scheinen. Zu erwähnen sind besonders *n*-Butylacetat-*n*-Butanol-10%ige Essigsäure (oder 10%ige Ameisensäure) im Verhältnis 4:1:5, bzw. *n*-Butylacetat-Methanol-0.1 *M*-Barbituratpuffer pH 8.2 (3:1:1; einphasig) oder Äthylacetat-*n*-Butanol-0.2% wässr. Ammoniak (7:1:8) oder Isoamylalkohol-conc. NH₄OH-Wasser (55:27:18). Die *R_F*-Werte einer grösseren Anzahl von Glucuroniden [250, 386] und Sulfaten [376, 386] sowohl von C₁₉-Steroiden, Progesteron- als auch Corticosteroid-

Metaboliten sind in der Literatur angegeben. Auch wassergesättigtes Butanol oder Äthylacetat-*n*-Butanol-0.2 *N*-Essigsäure (9:1:10) sind dafür geeignet, einschliesslich Oestrogen-Sulfate [263, 386]. Die Nachweismöglichkeiten sind recht zahlreich [386], z.B. UV-Absorption, *m*-Dinitrobenzol, Phosphomolybdänsäure, Antimontrichlorid sowie andere und im Fall der Sulfate Rhodizon [376].

(i) *Amino-Steroide und Steroid-Alkaloide*

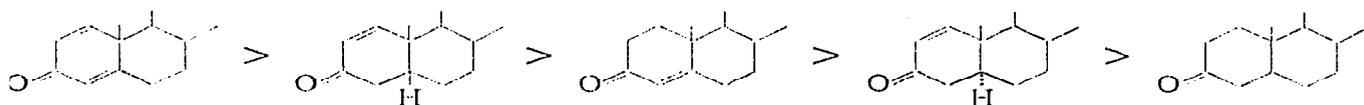
Als letzte Klasse seien schliesslich basisch substituierte Steroide und einige Alkaloide mit steroidähnlichem Skelett erwähnt. Für Steroidamine, die nur ein Stickstoffatom enthalten wird wassergesättigtes Butylacetat oder ein inverses System mit Kerosin (Paraffinöl) und wässrigem Alkohol vorgeschlagen [194]. Mit diesen Systemen lässt sich auch die Auftrennung von einigen 3α - und 3β -Isomeren erreichen. Für die Chromatographie von Alkaloiden aus *Holarrhena antidysenterica* (Conessin, Solanin etc.) geben die gleichen Autoren R_F -Werte in Amylalkohol-Essigsäure-Wasser (4:1:5; obere Phase) oder Paraffinöl/Äthanol-NH₄OH-Wasser (75:2:23; inverses System) an. Diese Systeme lassen sich in weiten Grenzen variieren; u.a. wurde auch Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5; obere Phase) als sehr nützlich befunden [278] für die genannten Alkaloide. Mit Äthylacetat-Essigsäure-Wasser (3:1:3; unter Zusatz von 15 Vol. % Äthanol zur oberen Phase) lassen sich die isomeren Solanine und Chaconine gut differenzieren [253]. Für Hydrierungsprodukte der Veratrinalkamine diente mit *M*-KCl imprägniertes Papier und mit 2%ig. HCl gesättigtes Butanol als mobile Phase [279], für hypotensive Alkaloide aus *Veratrum album* (Protoveratrine etc.) wiederum ein saures System: Äthylenchlorid-Essigsäure-Wasser (49.5:1:49.5) oder andere Lösungsmittel anstelle des Äthylenchlorids [377]. Als Indikatoren können teils solche für Steroide, teils solche für Alkaloide verwendet werden. Häufig kommen Antimontrichlorid, Antimonpentachlorid, Phosphomolybdänsäure, andere Fluoreszenzreaktionen (teilweise besitzen die Substanzen im UV Eigenfluoreszenz) oder z.B. Kaliumjodplatinat oder -wismuthat in Frage (s. Nachweisreaktionen, IV 1 e).

3. Chemische Struktur und chromatographisches Verhalten

Für das Verhalten der Steroide bei der Verteilungschromatographie lassen sich auf Grund systematischer Untersuchungen [178, 181, 232] und der Tabellen 30-49 eine Reihe von Gesetzmässigkeiten ableiten und zum Teil begründen. In einem gegebenen System ist der R_F -Wert zunächst von der Anzahl der C- und O-Atome abhängig, deren Verhältnis die Polarität der Substanz bis zu einem gewissen Grad bestimmt. Gleichwertige Sauerstofffunktionen vorausgesetzt, nimmt die Polarität z.B. der folgenden Reihe ab (und die R_F -Werte zu): C₁₈O₂ > C₁₉O₂ > C₂₁O₂; ebenso laufen z.B. Propionate schneller als entsprechende Acetate. Neben dem C/O-Verhältnis wird der R_F -Wert aber in erster Linie durch die Natur der Sauerstofffunktion bestimmt, deren Polarität sich folgendermassen verhält:



Laktongruppen üben im allgemeinen einen stärkeren Einfluss aus als gewöhnliche Estergruppen. Je nach Lage im Molekül ist der Einfluss der Ketogruppen unterschiedlich; Polarität der Ketone: C_3 oder $C_{20} > C_{11} > C_6$. Sie wird im weiteren durch konjugierte Doppelbindungen folgendermassen deutlich beeinflusst:



Während die Ringverküpfung (A/B *cis* oder *trans*) bei den Δ^1 -3-Ketonen noch eine Rolle spielt, ist dies bei den gesättigten 3-Ketonen praktisch nicht mehr der Fall; sie geben die gleichen R_F -Werte für Allo- und Normalreihe. Isolierte Doppelbindungen, z.B. $\Delta^9(11)$ haben ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den R_F -Wert. Hingegen verhalten sich Δ^5 -3 β -Hydroxysterioide in den meisten Fällen etwas polarer als die gesättigten wenn nicht zu viele andere Sauerstofffunktionen vorhanden sind. Besonders gross und unterschiedlich ist der Einfluss von Hydroxylgruppen. Er hängt ab

1. von ihrer Konformation (axial oder equatorial)
2. von sterischen Verhältnissen
3. von Wechselwirkungen mit dem Chromatographie-Milieu.

Es liess sich zeigen, dass alle Hydroxylgruppen in equatorialer Stellung stets polarer sind als diejenigen in axialer (vgl. Formelschema II und III auf S. 124) z.B.



Aus Tabelle 40 ergibt sich für Hydroxy-cortexone z.B. folgende Reihe

für P/Tol: $16\alpha > 15\alpha > 19 > 11\alpha > 7? > 12\alpha > 18 = 6\beta > 14\alpha > 17\alpha > 8$ od. $9 > 11\beta$

für F/Be- CHCl_3 : $16\alpha > 15\alpha > 19 > 7? > 11\alpha > 18 = 6\beta > 12\alpha > 8$ od. $9 > 14\alpha > 17\alpha > 11\beta$

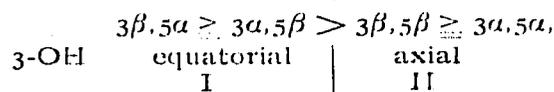
Für Mono-hydroxy-progesterone ergibt sich aus der Literatur:

mit P/Ligroin: $6\alpha > 16\alpha > 11\alpha > 6\beta > 14\alpha > 11\beta > 17\alpha > 21$

Die Beispiele zeigen, dass stets alle Hydroxylgruppen in equatorialer Stellung (e) polarer sind als jene in axialer Stellung (a), gleichgültig ob es sich um primäre oder sekundäre handelt. Die Differenzierung innerhalb jeder Gruppe (e oder a) wird u.a. durch sterische Faktoren bestimmt sein, und die einzelnen Verschiebungen innerhalb dieser Gruppen (e bzw. a) bei Wechsel von Lösungsmittelsystemen lässt sich wenigstens teilweise durch die Wechselwirkung zwischen Substanzen und Milieu erklären. Die Lage des Gleichgewichts von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substanz, mobiler und stationärer Phase sowie Cellulose, dürfte hierbei eine bedeutende Rolle spielen (vgl. auch [209] und das eigenartige Verhalten im E_2B -System, [347]). Gerade diese Unterschiede sind es, die für papierchromatographische Identifizierungen von grösstem Wert sind. Beispiele für die Sequenzänderung von Substanzen beim Wechsel von BUSH- auf ZAFFARONI-Systeme sind in den Tabellen leicht zu finden. Hier sei lediglich auf das schon klassische Beispiel des Aldosterons hingewiesen, das, besonders gut zu inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen befähigt, in verschiedenen Systemen im Vergleich zu Cortisol oder Cortison stark wechselnde R_F -Werte aufweist.

Die sterischen Verhältnisse der Ringe A und B bedürfen noch einer näheren Betrachtung. Die häufig zitierte Behauptung, dass Steroide mit 5α -Konfiguration

(A/B *trans*) schwächer polar sind, trifft in dieser Form sicher nicht zu. Die Polarität hängt auch hier weitgehend davon ab, ob sich im Ring A axiale oder equatoriale Substituenten befinden. Während sich, wie erwähnt, 5 α - oder 5 β -Steroide praktisch nicht trennen lassen, wenn sich im Ring A kein Substituent oder nur eine 3-Keto-Gruppe befindet, ändert sich die Situation grundlegend bei Vorliegen einer Hydroxyl-Gruppe in 3-Stellung. Unter Verwendung der Indices α und β für die Hydroxyl-Gruppe in 3- und das H-Atom in 5-Stellung, ergibt sich aus den Tabellen eindeutig folgende Polaritätsreihe (für C₁₉- und C₂₁-Steroide):



welche also direkt von der Konformation der Hydroxylgruppen und nicht von der Ringverknüpfung abhängig ist. Der Unterschied in der Polarität zwischen Gruppe I und II ist in den meisten Fällen gut und für Trennungen ausreichend. Der Unterschied innerhalb der einzelnen Gruppen ist durchschnittlich kleiner und hängt ziemlich stark von den übrigen Bedingungen wie Lösungsmittelsystem und zusätzliche Substituenten ab, so dass er für eine Trennung nicht immer ausreicht. Die 20 α -Hydroxy-Gruppe in C₂₁-Steroiden ist in der Regel polarer als die 20 β -Gruppe. Ausnahmen sind aber möglich je nach weiteren Substituenten und Lösungsmittelsystemen. Als Beispiel solcher Wechselwirkungen sei erwähnt, dass der Beitrag der 11 β -Hydroxy-Gruppe zur Polarität im ZAFFARONI-System grösser ist als derjenige der 20-Hydroxy-Gruppen, während im BUSH-System das Gegenteil der Fall ist [350]. Für Cardenolide [243] und Sapogenine [247, 259] gelten die gleichen Gesetzmässigkeiten wie sie für die Steroide diskutiert worden sind. Bemerkenswert ist jedoch, dass manche Monoglykoside schneller laufen als ihre Aglykone (vgl. Tab. 50; [229]).

Bei einer Betrachtung der bisher gefundenen Zusammenhänge zwischen Konstitution und dem Verhalten von Steroiden bei der Verteilungschromatographie sollte man aber auch auf die zusätzlichen und noch schwer vorauszusehenden schwächeren oder stärkeren Adsorptionserscheinungen achten, ebenso wie auf die gelegentlichen Verdrängungseffekte bei Gemischen. Wenn sich einerseits durch die sehr starke Differenzierung der Polarität von verschiedenen Sauerstofffunktionen ausgezeichnete Trennungsmöglichkeiten ergeben, so ist es andererseits leicht möglich, dass Steroide ganz unterschiedlichen Sauerstoffgehaltes in einem bestimmten System den gleichen R_F -Wert haben; so können sich z.B. Triketone wie Hydroxyketone oder Triole wie Dihydroxydiketone verhalten, wobei Unterschiede im C-Gehalt ebenfalls noch ausgleichend wirken können. Umso wertvoller ist hier die schon mehrmals erwähnte Möglichkeit der Differenzierung durch andere Lösungsmittelsysteme, verschiedene Farbreaktionen und zusätzliche physikalisch-chemische Teste (s. IV r f).

Herrn Dr. A. WETTSTEIN danke ich bestens für die Förderung dieser Arbeit, Herrn Dr. I. E. BUSH für die Mitteilung unveröffentlichter Befunde und Herrn E. VON ARX für die Ausführung der Zeichnungen.

LITERATUR

- 1 H. WEIL, *Chem. Ing. Technik*, 23 (1951) 422; *Chem. Ztg.*, 79 (1955) 206, 246.
- 2 E. LEDERER UND M. LEDERER, *Chromatography*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, 1957.
- 3 L. ZECHMEISTER UND L. V. CHOLNOKY, *Die chromatographische Adsorptionsmethode*, 2. Aufl., Springer, Wien, 1938.
- 4 L. ZECHMEISTER, *Progress in Chromatography 1938-1947*, Chapman & Hall, London, 1950.
- 5 L. VELLUZ, *Substances naturelles de synthèse*, Vol. 4, Masson, Paris, 1952, S. 105-147.
- 6 H. G. CASSIDY, *Adsorption and Chromatography; Technique of Organic Chemistry*, Vol. 5; *Fundamentals of Chromatography; Technique of Organic Chemistry*, Vol. 10, 1950, 1957 (A. WEISSBERGER, Ed.), Interscience, New York.
- 7 G. HESSE, *Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium*, de Gruyter, Berlin, 1943.
- 8 T. I. WILLIAMS, *Elements of Chromatography*, Blackie, London, 1954.
- 9 Symposium on Chromatography, *Discussions Faraday Soc.*, 7 (1949) 239.
- 10 A. W. K. TISELIUS, *Endeavour*, 11 (1952) 5.
- 11 H. H. STRAIN UND G. W. MURPHY, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 50.
- 12 A. J. P. MARTIN UND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1358.
- 13 A. J. P. MARTIN, *Ann. Rev. Biochem.*, 19 (1950) 517.
- 14 *Bull. soc. chim. France*, [5] (1951), Appendice.
- 15 D. H. R. BARTON, *Experientia*, 6 (1950) 316;
D. H. R. BARTON UND W. J. ROSENFELDER, *J. Chem. Soc.*, (1951) 1048.
- 16 D. H. R. BARTON, O. HASSEL, K. S. PITZER UND V. PRELOG, *Nature*, 172 (1953) 1096.
- 17 E. J. UMBERGER UND J. M. CURTIS, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 265.
- 18 D. R. IDLER UND C. A. BAUMANN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 623;
J. R. COFFMAN, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) xxviii.
- 19 E. B. TRICKEY, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3474.
- 20 W. M. STOKES, F. C. HICKEY UND W. A. FISH, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5174.
- 21 H. SILBERMAN UND S. SILBERMAN-MARTYNCEWA, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 359.
- 22 H. R. KRAYBILL, M. H. THORNTON UND K. E. ELDRIDGE, *Ind. Eng. Chem.*, 32 (1940) 1138.
- 23 M. H. THORNTON, H. R. KRAYBILL UND F. K. BROOME, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 2079.
- 24 W. S. REICH, *Compt. rend.*, 208 (1939) 748; *Biochem. J.*, 33 (1939) 1000.
- 25 M. E. LOMBARDO, TH. A. VISCELLI, A. MITTELMANN UND P. B. HUDSON, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 353.
- 26 J. G. HAMILTON, JR. UND R. T. HOLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 36 (1952) 456.
- 27 T. REICHSTEIN UND C. W. SHOPPEE, *Discussions Faraday Soc.*, 7 (1949) 305.
- 28 H. BROCKMANN UND H. SCHODDER, *Ber.*, 74 (1941) 73.
- 29 G. HESSE, I. DANIEL UND G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 103.
- 30 T. K. LAKSHMANAN UND S. LIEBERMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53 (1954) 258; *Federation Proc.*, 12 (1953) 235; *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 180.
- 31 E. DINGEMANSE, L. G. HUIS IN 'T VELD UND S. L. HARTOGH-KATZ, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 12 (1952) 66.
- 32 W. RITTEL, A. HUNGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 434.
- 33 K. EIK-NES, D. H. NELSON UND L. T. SAMUELS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 1280.
- 34 D. H. NELSON UND L. T. SAMUELS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 12 (1952) 519.
- 35 H. J. CAHNMANN, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1307.
- 36 R. NEHER, unveröffentlichte Daten.
- 37 H. MAIER-HUSER, Soc. Laboratoires des Proxymases, Paris, *D.B.P.*, 956.096 (17.5.1952).
- 38 A. H. NATHAN, Upjohn & Co., Kalamazoo, *D.B.P.* 946.801 (1.9.1951).
- 39 H. LEVY UND ST. KUSHINSKY, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 357.
- 40 S. G. JOHNSON, *Acta Endocrinol.*, 21 (1956) 127, 146, 157.
- 41 I. R. COOK, S. R. STITCH, A. E. HALL UND M. P. FELDMAN, *Analyt.*, 79 (1954) 24.
- 42 M. H. POND, *Lancet*, 261 (1951) 906.
- 43 K. DOBRINER, S. LIEBERMAN UND C. P. RHOADS, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 241.
- 44 B. L. RUBIN, H. ROSENKRANTZ, R. I. DORFMAN UND G. PINCUS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 568.
- 45 M. L. SWEAT, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1964.
- 46 W. J. HAINES UND J. N. KARNEMAAT, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1, Interscience, New York, 1954, p. 171.
- 47 E. HEFTMANN UND D. F. JOHNSON, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 519.
- 48 K. O. DONALDSON, V. J. TULANE UND L. M. MARSHALL, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 285.
- 49 F. GALINOVSKY UND O. VOGL, *Monatsh. Chem.*, 79 (1948) 325.
- 50 D. DANIEL, E. LEDERER UND L. VELLUZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 27 (1945) 218.
- 51 C. W. SHOPPEE, *J. Chem. Soc.*, (1946) 1138.

- 52 E. LEDERER, F. MARX, D. MERCIER UND G. PÉROT, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 1354.
53 L. RUZICKA, V. PRELOG UND E. TAGMANN, *Helv. Chim. Acta*, 27 (1944) 1149.
54 O. WINTERSTEINER UND M. MOORE, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 1503, 1507.
55 A. V. CRISTIANI UND V. ECK, *Z. physiol. Chem.*, 280 (1944) 127.
56 V. PRELOG, L. RUZICKA UND P. STEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 2222.
57 H. SCHÖN UND F. GEY, *Z. physiol. Chem.*, 303 (1956) 81.
58 L. VELLUZ, G. AMIARD UND A. PETIT, *Bull. soc. chim. France*, (1949) 501.
59 B. BORGSTRÖM, *Acta Physiol. Scand.*, 25 (1952) 111.
60 H. BRETSCHNEIDER, *Monatsh. Chem.*, 74 (1941) 53.
61 W. W. WELLS, D. L. COLEMAN UND C. A. BAUMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 57 (1955) 437.
62 N. H. CALLOW, *Biochem. J.*, 33 (1939) 559.
63 S. LIEBERMAN, D. K. FUKUSHIMA UND K. DOBRINER, *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 299.
64 R. V. BROOKS, W. KLYNE UND E. MILLER, *Biochem. J.*, 54 (1953) 212.
65 S. LIEBERMAN, K. DOBRINER, B. R. HILL, L. F. FIESER UND C. P. RHODES, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 263.
66 J. VON EUW, A. LARDON UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 27 (1944) 1287.
67 J. VON EUW UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 25 (1942) 988.
68 O. SCHINDLER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1698.
69 J. ELKS UND C. W. SHOPPEE, *J. Chem. Soc.*, (1953) 241.
70 H. REICH, M. SUTTER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 23 (1940) 170.
71 R. B. MOFFETT UND W. M. HOEHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 2098.
72 J. VON EUW UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1941) 879.
73 T. REICHSTEIN UND J. VON EUW, *Helv. Chim. Acta*, 21 (1938) 1197.
74 T. REICHSTEIN UND C. MONTIGEL, *Helv. Chim. Acta*, 22 (1939) 1212.
75 H. REICH, S. J. SANFILIPPO UND K. F. CRANE, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 713.
76 A. E. KELLIE UND A. P. WADE, *Biochem. J.*, 53 (1953) 582.
77 L. P. ROMANOFF, R. S. WOLF, M. CONSTANDSE UND G. PINCUS, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 928.
78 H. LEVY, R. W. JEANLOZ, R. P. JACOBSON, O. HECHTER, V. SCHENKER UND G. PINCUS, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 867.
79 A. S. MEYER, A. M. HAYANO, M. C. LINDBERG, M. GUT UND O. G. RODGERS, *Acta Endocrinol.*, 18 (1955) 148.
80 H. BRÄUNIGER, *Grundlagen und allgemeine Fragen der Papierchromatographie*, Volk und Gesundheit, Berlin, 1955.
81 J. SCHMIDLIN, G. ANNER, J. R. BILLETER, K. HEUSLER H. ÜBERWASSER, P. WIELAND UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1438.
82 R. SCHOENHEIMER UND E. A. EVANS, JR., *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 567.
83 M. KELLER, *Gynaecologia*, 136 (1953) 358.
84 J. B. BROWN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 185.
85 K. MEYER, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 718.
86 A. AEBI UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1013.
87 H. LICHTI, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1933.
88 P. R. O. BALLY, K. MOHR UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1740.
89 H. LICHTI, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1914.
90 W. NAGATA, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 41.
91 O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 18.
92 A. HUNGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 429.
93 J. J. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 183 (1950) 365.
94 O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 442.
95 A. UFFER, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 528.
96 H. R. URSCHELER, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 883.
97 K. MEYER, *Pharm. Acta Helv.*, 24 (1949) 222.
98 H. A. WALENS, A. TURNER, JR. UND M. E. WALL, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 325.
99 G. H. OTT UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 1799.
100 H. REICH UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 562.
101 E. SEEBECK UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 536.
102 CH. MEYSTRE, E. VISCHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 381.
103 E. HEFTMANN, *Chem. Revs.*, 55 (1955) 679.
104 H. E. STAVELY, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 3127.
105 I. E. BUSH, *Brit. Med. Bull.*, 10 (1954) 229.
106 F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1954.
107 H. HEUSSER, E. V. JENSEN, N. FRICK UND PL. A. PLATTNER, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 1326.
108 L. H. SARETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 1454.
109 D. K. FUKUSHIMA, S. LIEBERMAN UND B. PRAETZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 5205.

- 110 J. A. KEVERLING BUISMAN, W. STEVENS UND J. VAN DER VLIET, *Rec. trav. chim.*, 66 (1947) 83.
111 A. BUTENANDT UND L. POSCHMANN, *Ber.*, 77 (1944) 392.
112 S. LIEBERMAN UND D. K. FUKUSHIMA, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 5211.
113 M. BERENSTEIN, A. GEORG UND E. BRINER, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 258.
114 W. TRAPPE, *Biochem. Z.*, 306 (1940) 316.
115 V. R. MATTON UND H. L. MASON, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 215.
116 L. RUZICKA UND V. PRELOG, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 975.
117 L. RUZICKA, P. MEISTER UND V. PRELOG, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 867.
118 R. J. BLOCK, E. L. DURRUM UND G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1955.
119 W. M. STOKES, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67 (1957) 272.
120 J. H. LINFORD, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 1153.
121 L. H. GEVANTMAN, R. K. MAIN UND L. M. BRYANT, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 170.
122 J. E. PHILIP UND J. R. SCHENCK, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 170.
123 W. VOGT, *Chem.-Ingr.-Tech.*, 23 (1951) 580.
124 W. M. STOKES, W. A. FISH UND F. C. HICKEY, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 415.
125 L. L. RAMSAY UND W. I. PATTERSON, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 29 (1946) 337.
126 O. CRÉPY, M. F. JAYLE UND F. MESLIN, *Acta Endocrinol.*, 24 (1957) 233.
127 J. J. BARLOW, *Biochem. J.*, 65 (1957) 34 P.
128 W. R. SLAUNWHITE, JR. UND A. A. SANDBERG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 63 (1956) 478.
129 A. STOLL, E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL UND J. RENZ, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1460.
130 G. A. HOWARD UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 46 (1950) 532.
131 A. STOLL UND W. KREIS, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1431.
132 J. P. ROSSELET UND S. LIEBERMAN, *Federation Proc.*, 13 (1954) 284.
133 W. R. BUTT, P. MORRIS UND C. J. O. R. MORRIS, *Biochem. J.*, 49 (1951) 434.
134 W. S. BAULD, *Biochem. J.*, 63 (1956) 488.
135 H. HEGEDÜS, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 357.
136 R. W. H. EDWARDS UND A. E. KELLIE, *Chem. and Ind. (London)*, (1956) 250.
137 E. R. COOK, B. DELL UND D. J. WAREHAM, *Analyst*, 80 (1955) 215.
138 J. K. N. JONES UND S. R. STITCH, *Biochem. J.*, 53 (1953) 679.
139 S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 1163.
140 W. DIRSCHERL, W. KERNS UND H. SCHRIEFERS, *Z. physiol. Chem.*, 305 (1956) 116.
141 J. F. NYC, D. M. MARON, J. B. GARST UND H. B. FRIEDGOOD, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 77 (1951) 466.
142 S. BERGSTRÖM UND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 1267.
143 F. A. VON METZSCH, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 323.
144 H. BRAUNSBURG, M. I. STERN UND G. I. M. SWYER, *J. Endocrinol.*, 11 (1954) 189.
145 C. J. O. R. MORRIS UND D. C. WILLIAMS, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, 8 (1955) 157.
146 H. FRITZ UND A. BAUER, *Chem.-Ingr.-Tech.*, 26 (1954) 609.
147 R. E. HARMAN, E. A. HAM, D. D. DE YOUNG, N. G. BRINK UND L. H. SARETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5035.
148 E. H. MOSBACH, M. NIERENBERG UND F. E. KENDALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 2358.
149 W. J. HAINES, *Recent Progr. in Hormone Research*, 7 (1952) 255.
150 L. M. REINEKE, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1853.
151 C. J. O. R. MORRIS UND D. C. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 54 (1953) 470.
152 W. TAYLOR, *Biochem. J.*, 56 (1954) 463.
153 R. I. COX UND G. F. MARRIAN, *Biochem. J.*, 54 (1953) 353.
154 C. J. O. R. MORRIS UND D. C. WILLIAMS, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, 7 (1953) 261.
155 S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Mem. Soc. Endocrinol.*, No. 2 (1953) 9.
156 S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, 8 (1955) 204.
157 D. F. JOHNSON, E. HEFTMANN UND A. L. HAYDEN, *Acta Endocrinol.*, 23 (1956) 341.
158 P. B. BAKER, F. DOBSON UND S. W. STROUD, *Nature*, 168 (1951) 114.
159 D. BANES, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 42 (1953) 669.
160 P. J. AYRES, O. GARROD, S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Biochem. J.*, 65 (1957) 639.
161 E. R. KATZENELLENBOGEN, K. DOBRINER UND TH. H. KRITCHEVSKY, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 315.
162 K. DOBRINER, T. KRITCHEVSKY UND E. R. KATZENELLENBOGEN, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 177 (Discussion).
163 G. I. M. SWYER UND H. BRAUNSBURG, *J. Endocrinol.*, 7 (1951) lx.
164 M. I. STERN UND G. I. M. SWYER, *Nature*, 169 (1952) 769.

- 165 J. BITMAN UND J. F. SYKES, *Science*, 117 (1953) 356.
166 E. O. HAENNI, J. CAROL UND D. BANES, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 42 (1953) 162.
167 L. BOSCH, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 301.
168 W. S. BAULD, *Biochem. J.*, 59 (1955) 294.
169 G. F. MARRIAN UND W. S. BAULD, *Biochem. J.*, 59 (1955) 136.
170 D. BANES UND J. CAROL, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 42 (1953) 674.
171 E. H. MOSBACH, C. ZOMZELY UND F. E. KENDALL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1954) 95.
172 J. SJÖVALL, *Acta Physiol. Scand.*, 29 (1953) 232.
173 S. BERGSTRÖM UND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 611.
174 A. NORMAN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1413.
175 A. NORMAN, *Acta Physiol. Scand.*, 32 (1954) 1.
176 G. R. SVOBODA UND L. M. PARKS, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 43 (1954) 584.
177 I. E. BUSH, *Biochem. J.*, 50 (1952) 370.
178 A. ZAFFARONI, *Recent Progr. in Hormone Research*, 8 (1953) 51.
179 L. R. AXELROD, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 69.
180 K. SAVARD, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 185.
181 I. E. BUSH, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 321.
182 A. GRÜNE, *Chimia (Switz.)*, 11 (1957) 173, 213.
183 R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
184 E. B. HERSHBERG, E. OLIVETO, M. RUBIN, H. STAEUDLE UND L. KUHLEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1144.
185 R. H. LEVIN, B. J. MAGERLIN, A. V. MCINTOSH, JR., A. R. HANZE, G. S. FONKEN, J. L. THOMPSON; A. M. SEARCY, M. A. SCHERI UND E. S. GUTSELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 546.
186 R. B. MOFFETT UND H. V. ANDERSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 747.
187 G. SLOMP, JR., J. F. SHEALY, J. L. JOHNSON, R. A. DONIA, B. A. JOHNSON, R. P. HOLYSZ, R. L. PEDERSON, A. O. JENSEN UND A. C. OTT, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1216.
188 E. OLIVETO, C. GEROLD UND E. B. HERSHBERG, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 6113.
189 E. S. ROTHMAN UND M. E. WALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1744.
190 A. ZAFFARONI, R. B. BURTON UND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 109.
191 A. ZAFFARONI, R. B. BURTON UND E. H. KEUTMANN, *Science*, 111 (1950) 6.
192 M. L. QUAIFFE, R. P. GEYER UND H. R. BOLLIGER, *Abstracts of papers, 130th Meeting Am. Chem. Soc.*, (1956).
193 E. KODICEK UND D. R. ASHBEY, *Biochem. J.*, 57 (1954) xii.
194 Z. PROCHÁZKA, I. LÁBLER UND Z. KOTÁSEK, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 19 (1954) 1258.
195 R. P. MARTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 408.
196 Č. MICHÁLEC, V. JIRGL UND J. PODZIMEK, *Experientia*, 13 (1957) 242.
197 Č. MICHÁLEC, *Naturwiss.*, 42 (1955) 509.
198 J. KUČERA, Z. PROCHÁZKA UND K. VEREŠ, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 22 (1957) 1185.
199 F. MARKWARDT, *Arch. Pharm.*, 288 (1955) 82.
200 F. MARKWARDT, *Naturwiss.*, 41 (1954) 139.
201 TH. H. KRITCHEVSKY UND A. TISELIUS, *Science*, 114 (1951) 299.
202 D. KRITCHEVSKY UND M. R. KIRK, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4484.
203 C. GÜNZEL UND F. WEISS, *Z. anal. Chem.*, 140 (1953) 89.
204 P. KISS UND T. SZÉLL, *Naturwiss.*, 43 (1956) 448.
205 R. B. DAVIS, J. M. MCMAHON UND G. KALNITSKY, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4483.
206 H. SCHMIDT, H. J. STAUDINGER UND V. BAUER, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 128.
207 H. SCHMIDT UND H. J. STAUDINGER, *Angew. Chem.*, 66 (1954) 711.
208 I. E. BUSH UND D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.*, 52 (1952) 643.
209 W. DIRSCHERL UND E. GERHARDS, *Acta Endocrinol.*, 19 (1955) 233.
210 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *J. Clin. Invest.*, 35 (1956) 800.
211 B. L. RUBIN, R. I. DORFMAN UND G. PINCUS, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 629.
212 B. LEWIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 396.
213 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2278.
214 G. M. SHULL, J. L. SARDINAS UND R. C. NUBEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 37 (1952) 186.
215 D. G. EDGAR, *Biochem. J.*, 54 (1953) 50.
216 F. MICHEEL UND H. SCHWEPPE, *Mikrochim. Acta*, (1954) 53; *Angew. Chem.*, 66 (1954) 136.
217 B. LEWIS, *J. Clin. Pathol.*, 10 (1957) 148.
218 E. VON ARX UND R. NEHER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1664.
219 G. OERTEL, *Naturwiss.*, 43 (1956) 18.
220 K. SAVARD, H. W. WOTIZ, P. MARCUS UND H. M. LEMON, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 6327.
221 B. L. RUBIN, R. I. DORFMAN UND G. PINCUS, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 213.
222 N. A. DRAKE, W. J. HAINES, R. E. KNAUFF UND E. D. NIELSON, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 2036.

- 223 H. J. HÜBENER, E. HOFFMANN UND F. BODE, *Z. physiol. Chem.*, 289 (1952) 102.
 224 W. J. HAINES UND N. A. DRAKE, *Federation Proc.*, 9 (1951) 180.
 225 R. BERNASCONI, H. P. SIGG UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 1767.
 226 D. D. PERRIN, *Nature*, 178 (1956) 1244.
 227 G. OERTEL, *Acta Endocrinol.*, 16 (1954) 263.
 228 K. B. JENSEN, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 9 (1953) 99.
 229 O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 108.
 230 CH. D. KOCHAKIAN UND G. STIDWORTHY, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 607.
 231 L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 173.
 232 K. SAVARD, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 457.
 233 R. B. BURTON, A. ZAFFARONI UND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 763.
 234 E. HEFTMANN, P. BERNER, A. L. HAYDEN, H. K. MILLER UND E. MOSETTIG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 51 (1954) 329.
 235 G. OERTEL, *Acta Endocrinol.*, 16 (1954) 267.
 236 V. SCHWARZ, *Biochem. J.*, 53 (1953) 148.
 237 P. J. AYRES, S. A. SIMPSON UND J. F. TAIT, *Biochem. J.*, 65 (1957) 647.
 238 E. HEFTMANN, *Science*, 111 (1950) 571.
 239 TH. E. WEICHELBAUM UND H. W. MARGRAF, *J. Clin. Endocrinol.*, 17 (1957) 959.
 240 J. BEYREDER UND H. RETTENBACHER-DÄUBNER, *Monatsh. Chem.*, 84 (1953) 99.
 241 FR. JAMINET, *J. pharm. Belg.*, 7 (1952) 169.
 242 C. DE COURCY, *J. Endocrinol.*, 14 (1956) 164.
 243 E. HEFTMANN UND A. J. LEVANT, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 703.
 244 B. J. ALDRICH, M. L. FRITH UND S. E. WRIGHT, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 8 (1956) 1042.
 245 A. B. SVENDSEN UND K. B. JENSEN, *Pharm. Acta Helv.*, 25 (1950) 241.
 246 FR. JAMINET, *J. pharm. Belg.*, 6 (1951) 90.
 247 E. HEFTMANN UND A. L. HAYDEN, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 47.
 248 R. TSCHESCHE, G. GRIMMER UND F. SEEHOFER, *Chem. Ber.*, 86 (1953) 1235.
 249 D. KRITCHEVSKY UND M. R. KIRK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 35 (1952) 346.
 250 M. L. LEWBART UND J. J. SCHNEIDER, *Nature*, 176 (1955) 1175.
 251 J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 339.
 252 J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 6 (1952) 1552.
 253 R. KUHN UND J. LÖW, *Angew. Chem.*, 66 (1954) 639.
 254 R. F. WITTER UND S. STONE, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 156.
 255 C. HEUSGHEM, *Nature*, 171 (1953) 42.
 256 A. GHILAIN, *Ann. endocrinol. (Paris)*, 16 (1956) 477.
 257 E. HABERMANN, W. MÜLLER UND A. SCHREGLMANN, *Arzneimittel-Forsch.*, 3 (1953) 30.
 258 D. LAWDAY, *Nature*, 170 (1952) 415.
 259 CH. SANNIÉ UND H. LAPIN, *Bull. soc. chim.*, (1952) 1080.
 260 CH. SANNIÉ, S. HEITZ UND H. LAPIN, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1670.
 261 M. D. SIPERSTEIN, F. M. HAROLD, I. L. CHAIKOFF UND W. G. DAUBEN, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 181.
 262 H. ROSENKRANTZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, 44 (1953) 1.
 263 G. CAVINA, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 31 (1955) 1668.
 264 CH. RIDDELL UND R. P. COOK, *Biochem. J.*, 61 (1955) 657.
 265 J. M. McMAHON, R. B. DAVIS UND G. KALNITSKY, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 75 (1950) 799.
 266 L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 59.
 267 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 276.
 268 G. T. BASSIL UND R. J. BOSCOTT, *Biochem. J.*, 48 (1951) xlviii.
 269 W. J. McALEER UND M. A. KOZLOWSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 66 (1957) 125.
 270 G. BRANTE, *Nature*, 163 (1949) 651.
 271 J. PROCHASKA, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 19 (1954) 98.
 272 D. H. R. BARTON, *Nature*, 170 (1952) 250.
 273 C. GÜNZEL UND F. WEISS, *Pharmazie*, 10 (1955) 725.
 274 W. J. McALEER UND M. A. KOZLOWSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 66 (1957) 120.
 275 T. TSUKAMOTO, T. KAWASAKI, A. NARAKI UND T. YAMAUCHI, *J. Pharm. Soc. Japan*, 74 (1954) 1097.
 276 M. FRÈREJAQUE UND M. DURGEAT, *Compt. rend.*, 236 (1953) 410.
 277 W. J. McALEER UND M. A. KOZLOWSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 196.
 278 R. TSCHESCHE UND R. PETERSON, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1719.
 279 H. AUETERHOFF, *Arch. Pharm.*, 287 (1954) 380.
 280 A. ZAFFARONI UND R. B. BURTON, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 749.
 281 J. M. MANARO UND A. ZYGMUNTOWICZ, *Endocrinology*, 48 (1951) 114.
 282 A. PUCK, *Klin. Wochschr.*, 33 (1955) 865.
 283 J. A. CIFONETTI UND F. SMITH, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1132.

- 284 J. BOUTE, *Ann. endocrinol.* (Paris), 14 (1953) 518.
285 F. L. MITCHELL UND R. E. DAVIES, *Biochem. J.*, 56 (1954) 690.
286 N. L. DUTTA, *Nature*, 175 (1955) 85.
287 H. SILBERMAN UND R. H. THORP, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 5 (1953) 438.
288 K. WOLFF, *Pharmazie*, 10 (1955) 371.
289 E. BOJESSEN, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 8 (1956) 55.
290 W. S. RULIFSON, H. M. LANG UND J. P. HUMMEL, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 839.
291 L. L. SMITH UND S. J. STATER, *Texas Repts. Biol. and Med.*, 12 (1954) 543.
292 R. D. H. HEARD, R. JACOBS, V. O'DONNELL, F. G. PERON, J. C. SAFFRAN, S. S. SOLOMON, L. M. THOMPSON, H. WILLOUGHBY UND C. H. YATES, *Recent Progr. in Hormone Research*, 9 (1954) 383.
293 D. L. BERLINER UND H. A. SALHANICK, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1608.
294 R. J. BOSCOTT, *Biochem. J.*, 51 (1952) xlv.
295 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 2062.
296 N. J. HOLNESS, J. B. LUNNON UND C. H. GRAY, *J. Endocrinol.*, 14 (1956) 138.
297 A. E. KELLIE UND E. R. SMITH, *Nature*, 178 (1956) 323.
298 L. R. AXELROD, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1308.
299 E. B. ROMANOFF UND CH. A. HUNT, *Endocrinology*, 57 (1955) 499.
300 I. E. BUSH, *Biochem. J.*, 59 (1955) xiv.
301 L. R. AXELROD, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4074.
302 A. BODANSKY UND J. KOLONITSCH, *Nature*, 175 (1955) 729.
303 A. S. MEYER, *J. Org. Chem.*, 20 (1955) 1240.
304 J. ZANDER, H. SIMMER, A. M. V. MÜNSTERMANN UND E. MARX, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 529.
305 W. J. NOWACZYNSKI, E. KOIW UND J. GENEST, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 35 (1957) 425.
306 G. DIAZ, A. ZAFFARONI, G. ROSENKRANTZ UND C. DJERASSI, *J. Org. Chem.*, 17 (1952) 747.
307 H. A. WALENS, A. TURNER, JR. UND M. E. WALL, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 325.
308 P. R. STEYERMARK UND W. J. NOWACZYNSKI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 1.
309 W. J. NOWACZYNSKI UND P. R. STEYERMARK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 453.
310 W. J. NOWACZYNSKI UND P. R. SEYERMARK, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 592.
311 L. DORFMAN, *Chem. Revs.*, 53 (1953) 47.
312 W. J. MADER UND R. R. BUCK, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 666.
313 W. J. NOWACZYNSKI, M. GOLDNER UND J. GENEST, *J. Lab. Clin. Med.*, 45 (1955) 818.
314 D. ABELSON UND P. K. BONDY, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 922.
315 D. ABELSON UND P. K. BONDY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 57 (1955) 208.
316 H. TAUBER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1494.
317 J. GREEN, *Biochem. J.*, 47 (1950) i.
318 C. C. PORTER UND R. H. SILBER, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 201.
319 R. W. H. EDWARDS UND A. E. KELLIE, *Biochem. J.*, 56 (1954) 207.
320 E. M. RICHARDSON, J. C. TOUCHSTONE, F. C. DOHAN, H. BULASCHENKO, J. LANDOLT UND W. APPLIN, *J. Clin. Invest.*, 34 (1955) 285.
321 G. ARROYAVE UND L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 579.
322 R. B. BURTON, A. ZAFFARONI UND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 769.
323 R. NEHER, *International Symposium on Aldosterone* (Ed. A. F. MULLER AND C. M. O'CONNOR), Churchill, London, 1958, p. 11.
324 H. REICH, D. H. NELSON UND A. ZAFFARONI, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 411.
325 J. F. NYC, J. B. GARST, H. F. FRIEDGOOD UND D. M. MASON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 29 (1950) 219.
326 C. H. HASSALL UND S. L. MARTIN, *J. Chem. Soc.*, (1951) 2766.
327 C. DE COURCY, I. E. BUSH, C. H. GRAY UND J. B. LUNNON, *J. Endocrinol.*, 9 (1953) 401.
328 M. FUJISAKI UND Y. ARAI, *Endocrinol. Japon.*, 3 (1956) 1.
329 CH. ÉGER, *Experientia*, 12 (1956) 37.
330 M. BEROZA, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1550.
331 A. C. PALADINI UND L. F. LÉLOIR, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1024.
332 D. M. TENENT, J. B. WHITLA UND K. FLOREY, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1748.
333 E. M. RICHARDSON, J. C. TOUCHSTONE UND F. C. DOHAN, *J. Clin. Invest.*, 34 (1955) 285.
334 H. HOFMANN UND H. J. STAUDINGER, *Naturwiss.*, 38 (1951) 213.
335 H. HOFMANN UND H. J. STAUDINGER, *Biochem. Z.*, 322 (1952) 230.
336 J. C. TOUCHSTONE UND CHIEN TIEN HSU, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1517.
337 F. L. MITCHELL, *Nature*, 170 (1952) 621.
338 R. J. BOSCOTT, *Chem. and Ind.* (London), (1952) 472.
339 R. J. BOSCOTT, *Biochem. J.*, 48 (1951) xlvii.
340 E. HEFTMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 851.
341 I. E. BUSH UND A. A. SANDBERG, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 783.
342 S. McDONOUGH, *Nature*, 173 (1954) 645.

- 343 A. ZAFFARONI, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3828.
344 S. BERNSTEIN UND R. H. LENHARD, *J. Org. Chem.*, 18 (1953) 1146; 19 (1954) 1269.
345 G. M. SHULL, *Abstracts of Papers, 126th Meeting Am. Chem. Soc.*, (1954).
346 M. M. PECHET, *Science*, 121 (1955) 39.
347 W. R. EBERLEIN UND A. M. BONGIOVANNI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 90.
348 W. J. NOWACZYNSKI UND E. KOIV, *J. Lab. Clin. Med.*, 49 (1957) 815.
349 E. H. SAKAL UND E. J. MERRILL, *Science*, 117 (1953) 451.
350 H. J. HUBENER, D. K. FUKUSHIMA UND T. F. GALLAGHER, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 499.
351 V. R. MATTOX, H. L. MASON UND A. ALBERT, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 359.
352 C. H. GRAY, M. A. S. GREEN, M. J. HOLNESS UND J. B. LUNNON, *J. Endocrinol.*, 14 (1956) 146.
353 H. S. BLOCH, B. ZIMMERMANN UND S. L. COHEN, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 1206.
354 R. NEHER, *Determination of Individual Adrenocortical Steroids, Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1958, im Druck.
355 I. E. BUSH, Persönliche Mitteilung.
356 J. A. LUETSCHER, JR., R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Experientia*, 10 (1954) 456; *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 505.
357 K. B. JENSEN, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 10 (1954) 69.
358 M. OKADA UND A. YAMADA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 72 (1952) 933.
359 M. OKADA, A. YAMADA UND K. KOMETANI, *J. Pharm. Soc. Japan*, 72 (1952) 930.
360 G. VASTAGH UND J. TUZSON, *Pharm. Zentralhalle*, 92 (1953) 88.
361 H. SILBERMAN UND R. H. THORP, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 6 (1954) 546.
362 R. TSCHESCHE UND F. SEEHOFER, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1108.
363 Y. SASAKAWA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 74 (1954) 721.
364 P. MESNARD UND A. LAFARGUE, *Ann. pharm. franç.*, 12 (1954) 285.
365 E. SCHENKER, A. HUNGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 680.
366 R. MAULI, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 305.
367 FR. KAISER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
368 G. J. RIGBY UND D. M. BELLIS, *Nature*, 178 (1956) 415.
369 J. P. RUCKSTUHL UND K. MEYER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1270.
370 CH. SANNIÉ UND H. LAPIN, *Compt. rend.*, 235 (1952) 581.
371 G. A. D. HASLEWOOD, *Biochem. J.*, 56 (1954) 581.
372 D. KRITCHEVSKY UND M. R. KIRK, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4731.
373 K. TONAKA UND K. TAKEDA, *J. Biochem. (Japan)*, 39 (1952) 333.
374 J. SJÖVALL, *Arkiv Kemi*, 8 (1955) 299, 317.
375 S. ERIKSON UND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 1099.
376 J. J. SCHNEIDER UND M. L. LEWBART, *J. Biol. Chem.*, 222 (1956) 787.
377 H. A. NASH UND R. M. BROOKER, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 1942.
378 H. C. MURRAY UND D. H. PETERSON, *U.S. Pat.* 2,602,769 (1952).
379 TH. L. DAO, *Endocrinology*, 61 (1957) 242.
380 F. J. LOOMEIJER UND G. M. LUNGE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 179.
381 B. CAMBER, *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 188.
382 ST. DAL NOGARE UND J. MITCHELL, JR., *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1376.
383 R. K. CALLOW, D. H. W. DICKSON, J. ELKS, R. M. EVANS, V. H. T. JAMES, A. G. LONG, J. F. OUGHTON UND J. E. PAGE, *J. Chem. Soc.*, (1955) 1966.
384 R. P. MARTIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 408.
385 H. SCHRÖTER, CH. TAMM, T. REICHSTEIN UND V. DELLOFEU, *Helv. Chim. Acta*, 41 (1958) 140.
386 G. CAVINA, *Rend. ist. super. sanità*, 20 (1957) 923.
387 H. DANIELSSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 401.
388 H. STRUCK, *Naturwiss.*, 45 (1958) 41.
389 F. J. RITTER UND J. HARTEL, *Nature*, 181 (1958) 765.